

THESIS

MUNICH

1968

ZUM STOFFWECHSEL DER FREIEN ESSIGSÄURE
IM TIERKÖRPER

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
MEDICAL CENTER
STANFORD, CALIF. 94305

Hanns L We i ß

AUS DER II. MEDIZINISCHEN KLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Prof. Dr. Dr. G. Bodechtel

ZUM STOFFWECHSEL DER FREIEN ESSIGSÄURE
IM TIERKÖRPER

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Hanns Weiß
aus Bad Mergentheim

München 1968

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent:	Prof. Dr. O. WIELAND
Korreferent:	Prof. Dr. Dr. G. BODECHTEL
Dekan:	Prof. Dr. F. HOLLE

Tag der mündlichen Prüfung: 2.7.1968

A. EINLEITUNG	7
B. EXPERIMENTELLER TEIL	10
I. METHODEN ZUR BESTIMMUNG FREIER ESSIGSÄURE	10
1. Übersicht	10
2. Bestimmung freier Essigsäure nach F. LUNDQUIST	15
II. METHODEN ZUR BESTIMMUNG DER ACETYL-CoA-DEACYLASE	22
1. Übersicht	22
2. Bestimmung des bei enzymatischer Hydrolyse des Acetyl-CoA freigesetzten Acetats mit dem katalytischen Test	25
3. Bestimmung der bei enzymatischer Hydrolyse des Acetyl-CoA freigesetzten Sulfhydryl-Gruppen mit dem Dichlorphenolindolphenol-Test	40
C. ERGEBNISSE	43
I. VERTEILUNG DER ESSIGSÄURE IM TIERKÖRPER	43
II. ESSIGSÄURE IM BLUT	43
1. Acetatgehalt des Blutplasmas einiger Säugetiere	43
2. Acetatgehalt von Human- und Rattenblut aus verschiedenen Abschnitten der Blutbahn	44
3. Abhängigkeit des Plasmaacetatspiegels von der Futteraufnahme bei Wiederkäuern	45
4. Plasmaacetatspiegel nach oraler Acetatbelastung bei Ratten	46
5. Plasmaacetatspiegel bei alimentärer Lipämie bei Ratten	46
6. Abhängigkeit des Plasmaacetatspiegels von der Schilddrüsenfunktion bei Ratten	46
7. Plasmaacetatspiegel chronisch diabetischer Ratten	49
8. Plasmaacetatspiegel bei Alkoholbelastung	49

III. ZUR FRAGE DER BINDUNG DES BLUTACETATS AN SERUMPROTEINE	51
IV. ACETATSTOFFWECHSEL DER LEBER	54
V. ACETATSTOFFWECHSEL ROTER BLUTZELLEN	58
VI. ACETATSTOFFWECHSEL WEISSER BLUTZELLEN	58
VII. ACETATSTOFFWECHSEL IN TUMORZELLEN	63
VIII. ACETYL-CoA-DEACYLASE	71
1. Aktivität der Deacylase in verschiedenen Organen der Ratte	71
2. Lokalisation und Substrataffinität der Deacylase in der Leberzelle	73
3. Aktivität der Deacylase in gealtertem Lebergewebe	76
4. Acetyl-CoA-Deacylase in Tumorzellen	76
D. DISKUSSION	77
E. ZUSAMMENFASSUNG	85
F. LITERATURVERZEICHNIS	87

Folgende Abkürzungen wurden verwendet:

AA-ase	Arylaminoacetylase
Ac-P	Acetyl-Phosphat
ADP	Adenosin-Diphosphat
AGT	Acetyl-Phosphat-Glucose-6-Phosphotransferase
AK	Acetokinase
AMP	Adenosin-Monophosphat
ATP	Adenosin-Triphosphat
CoA	Coenzym A
DPJ	Dichlorphenolindolphenol
DPN	Diphosphopyridinnucleotid
G-6-PDH	Glucose-6-Phosphat-dehydrogenase
HMG-CoA	β -Hydroxy- β -methyl-glutaryl-Coenzym A
KBR	Krebs-Bicarbonat-Ringerlösung
LDH	Lactatdehydrogenase
MDH	Malatdehydrogenase
PK	Pyruvatkinase
p-NA	p-Nitroanilin
PP	Pyrophosphat
TK	Thiokinase
TPN	Triphosphopyridinnucleotid



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153513_0063

A. E I N L E I T U N G

Die Essigsäure war schon im Altertum durch ihr Auftreten beim Sauerwerden des Weines bekannt. Nachdem in der Mitte des vorigen Jahrhunderts die Hefezellen als Ursache der Gärung erkannt worden waren, konnte zu Beginn dieses Jahrhunderts die Essigsäure als Ausscheidungsprodukt zahlreicher Mikroorganismen nachgewiesen werden, denen verschiedenartige Stoffe, wie Zucker, Cellulose, Glycerin, Citronensäure, Aminosäuren und Proteine als Nährsubstanz dienten (4). Doch deuteten schon damals Experimente darauf hin, daß Acetat nicht nur ein Endprodukt, sondern auch ein Zwischenprodukt des Zellchemismus sein müsse. So konnte BUCHER mit zellfreiem Hefepreßsaft die Bildung der Essigsäure aus Zucker nachweisen, sie also als Zwischenprodukt anhäufen, während intakte Hefezellen keine Essigsäure ausscheiden (16). H. WIELAND forderte in einer Übersicht über die Wege der biologischen Oxydation daß der Abbau der Milchsäure, als einem vermuteten Zwischenprodukt des Zuckerabbaus, über die Stufe der Brenztraubensäure und des Acetaldehyds zur Essigsäure führe (106). Er konnte ferner beweisen, daß ein Essigsäuremolekül an der Synthese der Citronensäure unmittelbar beteiligt ist (107). Als MARTIUS und KNOOP erkannten, daß Citronensäure weiter zu Ketoglutarensäure und Bernsteinsäure abgebaut wird, war der Anschluß an bereits bekannte Zwischenprodukte des oxydativen Zuckerabbaus hergestellt. KREBS formulierte schließlich den cyclischen Endabbau von Essigsäure, den Citronensäurecyclus (51). Aber erst die Anwendung von radioaktiv markierten Isotopen bewies sicher, daß Essigsäure im Citronensäurecyclus verbrannt wird und aus Brenztraubensäure nach Decarboxylierung und Oxydation entsteht (71, 104). Auch der oxydative Abbau der Fettsäuren sollte der KNOOP-DAKINSchen Formulierung entsprechend zur Bildung von Acetat führen (47).

Die Vorstellung, daß freie Essigsäure als direktes Zwischenprodukt auftrete, erwies sich jedoch als unhaltbar. So bemerkte LYNEN beim Arbeiten mit an endogenen Nährstoffen verarmter, gealterter Hefe eine mehrstündige Verzögerung des Essigsäureverbrauches im Gegensatz zu frisch geernteter Hefe. Diese Latenz ließ sich durch Zusatz von rasch oxydablen Substanzen, wie Alkoholen und Glucose aufheben (63). LYNEN folgerte daraus, daß eine Aktivierung der Essigsäure vor ihrer Kondensation zu Citrat nötig sei. Die erforderliche Energie erhält die verarmte Hefe erst durch Oxydation eines zugegebenen Substrates. Es bedeutete einen entscheidenden Fortschritt als LIPMAN bei *Lactobacillus delbrüchii* als Reaktionsprodukt des oxydativen Brenztraubensäure-

abbaus das Anhydrid zwischen Essigsäure und Phosphorsäure, Acetyl-Phosphat entdeckte (53). Jedoch konnte LYNEN in Hefe die Kondensation von Acetyl-Phosphat mit Oxalessigsäure nicht verwirklichen (77). Auch in tierischem Enzymmaterial ließ sich mit Acetyl-Phosphat z. B. die Sulfanilamidacetylierung nicht durchführen (55). Acetyl-Phosphat konnte also nicht die Form der aktivierten Essigsäure in Hefe und in tierischem Gewebe sein.

Weitere Arbeiten über die biologische Acetylierung führten schließlich zu der Beobachtung NACHMANNSOHNs, daß bei der Synthese des Acetylcholins neben ATP als Energieträger noch ein weiterer Faktor nötig ist (76). Zu dem gleichen Ergebnis kam LIPMAN bei der Untersuchung der Sulfanilamidacetylierung mit gelösten Leberenzymen. Durch Alterung inaktivierten Leberextrakt konnte er mit Kochsaft aus frischer Hefe reaktivieren (54). Er nannte diesen zur Acetylierungsreaktion nötigen Cofaktor Coenzym A. Es zeigte sich nun, daß ein System aus Acetat, ATP und Coenzym A zusammen mit Leberenzym alle Eigenschaften der geforderten aktivierten Essigsäure hatte (78, 87, 91, 92). 1951 war dann mit der Isolierung und Strukturermittlung des Acetyl-Coenzym A durch LYNEN die Suche nach der reaktionsfähigen, aktiven Form der Essigsäure beendet (65).

Wie man heute weis, nimmt die aktivierte Essigsäure eine zentrale Stellung im Zellstoffwechsel ein (22). So geht der oxydative Abbau der Kohlehydrate über die Brenztraubensäure zu Acetyl-Coenzym A (15, 34, 44, 48, 79, 81). Der successive oxydative Abbau der Fettsäuren, die β -Oxydation, endet bei Acetyl-Coenzym A (70) und auch der Abbau von Aminosäuren führt zu Acetyl-Coenzym A. Bei ungestörtem Zellstoffwechsel wird der größte Teil der aktivierten Essigsäure, gleichgültig welcher Herkunft, nach Kondensation mit Oxalessigsäure zu Citronensäure (96) im Citronensäurecyclus zu Kohlendioxyd und Wasser verbrannt (51). Auf dem Weg der Umkehrung der β -Oxydation können höhere Fettsäuren aus Acetyl-Coenzym A synthetisiert werden (11, 68, 83, 95, 101, 102). Durch den Weg der Kondensation dreier Moleküle Acetyl-Coenzym A über Acetacetyl-Coenzym A zu Hydroxymethyl-glutaryl-Coenzym A ist die aktivierte Essigsäure Ausgangssubstanz zur Bildung von Acetacetat im HMG-CoA Cyclus (67), sowie zur Bildung von Cholesterin (8). Alle diese Stoffwechselwege, deren gemeinsamer Treffpunkt die aktivierte Essigsäure darstellt, sind mit wenigen Ausnahmen genau beschrieben und auch in ihrer physiologischen Bedeutung gut zu übersehen.

In der vorliegenden Arbeit soll die Stellung der nicht aktivierten, also der freien Essigsäure im Zellstoffwechsel höherer Organismen näher beleuchtet werden. Über das Vorkommen freien Acetats, sein Verhalten während physiologischer und pathologischer Stoffwechselzustände und die Wege seiner Entstehung liegen bisher nur vereinzelte Ergebnisse

vor. Dieser Mangel an Information beruht wohl hauptsächlich auf der Schwierigkeit der quantitativen Analyse der in nur sehr geringen Mengen auftretenden freien Essigsäure. Diese Arbeit beschreibt zunächst einige Möglichkeiten der quantitativen Bestimmung freier Essigsäure. Sodann wird auf die Ergebnisse im einzelnen eingegangen und zuletzt der Stoffwechsel der freien Essigsäure im Zusammenhang mit dem Stoffwechsel der aktivierten Essigsäure diskutiert.

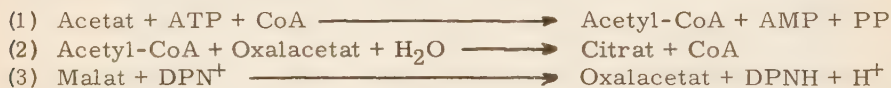
B. EXPERIMENTELLER TEIL

I. METHODEN ZUR QUANTITATIVEN BESTIMMUNG DER FREIEN ESSIGSÄURE

1. ÜBERSICHT

Die Konzentration freier Essigsäure im Blut und in Geweben höherer Organismen ist sehr gering, so daß ihre quantitative Erfassung lange Zeit auf Schwierigkeiten stieß. Verschiedene Vorschläge wurden unterbreitet:

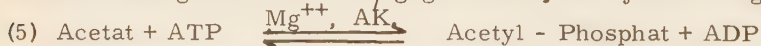
KORFF (48) erpropte in Verbindung mit einem Destillationsschritt nach BARTLEY (3) (siehe unten) ein Enzymsystem aus Kaninchenherzen. Die enzymatische Reaktion bestand in der Aktivierung der Essigsäure zu Acetyl-CoA (Gl. 1) und der anschließenden Kondensation mit Oxalacetat (Gl. 2), das durch die Oxydation von Malat entstand (Gl. 3). Der letzte Schritt war im optischen Test nach WARBURG am Auftreten von DPNH_2 zu verfolgen und diente als Indikatorreaktion.



Die verwandten Enzympräparate waren jedoch zu instabil und enthielten zudem Laktatdehydrogenase, was eine empfindliche Störung durch Pyruvat nach Gl. 4 bewirkte.

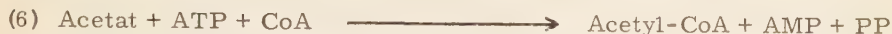


ROSE (80) überführte Acetat mit einer Acetokinase aus *Escherichia Coli* in Acetyl-Phosphat (Gl. 5), das er als Eisenhydroxamat kolorimetrisch bestimmte. Die Empfindlichkeit dieser Methode, die den Nachweis von Acetat in Mengen von 30-150 μg gestattete, war jedoch zu gering.



Bei der von LUNDQUIST (60) später angegebenen Methode wird die Essigsäure aus perchlorsaurem Plasma- bzw. Gewebsextrakt durch Mikrodiffusion nach CONWAY (21) abgetrennt und anschließend im Sulfanilamidacetylierungs-Test nach SOODAK und LIPMAN (88) enzymatisch bestimmt. In einer ersten Reaktion wird Acetat mit ATP und Coenzym A zu Acetyl-CoA aktiviert (Gl. 6). Die zweite Reaktion besteht in der Übertragung des Acetylrestes auf Sulfanilamid (Gl. 7). Als Enzympräparat dient ein angereicherter Extrakt aus Taubenleberacetonepulver (89). Das nicht acetylierte Sulfanilamid wird anschließend kolorimetrisch nach BRATTON und MARSHALL bestimmt (12). Da es sich gemäß der Bilanzgleichung um einen stöchiometrischen Umsatz von Acetat handelt (Gl. 8),

entspricht die Menge des verbrauchten Sulfanilamids der vorgelegenen Acetatmenge.



Die vorausgehende Isolierung der Essigsäure ist erforderlich, da der enzymatische Test freie und aktivierte Essigsäure gleichermaßen erfaßt und außerdem durch Acetessigsäure und Alkaliionen gestört wird.

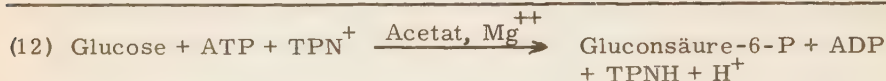
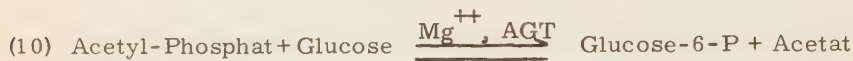
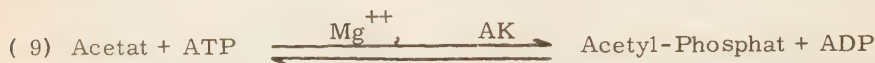
Mit dieser von LUNDQUIST beschriebenen Bestimmungsmethode wurde der größte Teil der experimentellen Daten dieser Arbeit gewonnen. So zuverlässig sie durch die Kombination der Mikrodifffusion, der enzymatischen Acetylierung und des kolorimetrischen Nachweises des nicht acetylierten Sulfanilamides ist, so umständlich und zeitraubend ist andererseits ihre Ausführung. Wegen des in erster Linie durch den Mikrodifffusionsschritt verursachten mittleren absoluten Fehlers von ca. $0,005 \mu \text{ Mol}$ Acetat ist auch ihre Empfindlichkeit begrenzt. Es wurden deswegen andere Möglichkeiten der Abtrennung freier Essigsäure untersucht:

Eine hinreichende Trennung von Acetat und Acetyl-CoA war durch Gel-filtration mit Sephadex-Gel G-25 (Pharmacia, Upsala) zu erzielen. Die um den Coenzym-A Rest größeren Acetyl-CoA Moleküle durchfließen eine Gel-Säule schneller als die kleineren Acetat-Moleküle. (Vgl. Abb. 3, S. 27) (Diese Methode diente zur Reinigung von Acetyl-CoA Präparaten (siehe unten)). Ihre Eignung als Trennungsmethode für Acetat zu dessen quantitativer Bestimmung wurde erst kurz vor Beendigung der vorliegenden Arbeit untersucht. Zur routinemäßigen Acetatbestimmung wurde sie nicht angewandt.

Wie Untersuchungen nach Abschluß der vorliegenden Arbeit zeigten, stellt die Vakuumdestillation nach BARTLEY (3) eine wesentliche Verbesserung dar. Dabei wird die Essigsäure eines perchlorsauren Extraktes aus einem im Wasserbad auf 50°C erwärmten Rundkölbchen im Vakuum durch ein absteigendes Rohr in eine auf -20°C abgekühlte Vorlage destilliert. Die Abtrennung der Essigsäure erfolgt dabei fast quantitativ (95 %) innerhalb von 2 Stunden. Die Genauigkeit und Empfindlichkeit dieser Vakuumdestillation entspricht der der erwähnten Mikrodifffusion (23).

Bei der Suche nach empfindlicheren Methoden zum Nachweis des Acetates schien sich ein von ANDERSON in einer Kurzmitteilung (46) beschrie-

benes Enzym anzubieten, das von Acetyl-Phosphat Phosphat auf Glucose überträgt, die Acetyl-Phosphat-Glucose-6-Phosphotransferase (AGT). Dieses Enzym sollte in Verbindung mit der Acetokinase, einem Enzym, das die Bildung von Acetyl-Phosphat aus ATP und Acetat katalysiert, und dem Zwischenferment, der TPN-abhängigen Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, folgende Reaktionsfolge zur Acetatbestimmung ermöglichen



In der ersten Reaktion (Gl. 9) entsteht aus Acetat und ATP Ac-P und ADP. Die zweite Reaktion (Gl. 10) besteht in der Übertragung des Phosphats von Ac-P auf Glucose unter Bildung von Glucose-6-P. Die dritte Reaktion (Gl. 11) stellt die Indikatorreaktion zur optischen Bestimmung der entstandenen Menge an Glucose-6-P dar. Das in Reaktion 2 (Gl. 10) wieder frei gewordene Acetat tritt erneut in Reaktion 1 (Gl. 9) ein. Die Konzentration der vorhandenen Essigsäure ist also geschwindigkeitsbestimmend für die Bildung von Glucose-6-P und damit von TPNH₂, die durch Extinktionszunahme bei 344 μm direkt optisch meßbar wird.

Von den drei erforderlichen Enzymen ist die Glucose-6-P-Dehydrogenase im Handel zu erwerben (Firma "Biochemica" Boehringer, Mannheim). Ein Acetokinase-Präparat wurde freundlicherweise von Firma "Biochemica" Boehringer zur Verfügung gestellt⁺⁺. Für die Präparation der AGT aus *Aerobacter aerogenes* wurde ein eigenes Verfahren ausgearbeitet (siehe unten).

Dieses Enzym, dessen Reinigung sehr weit gelang, erwies sich jedoch als nicht ausreichend-spezifisch. Es überträgt außer von Acetyl-Phosphat noch von anderen Phosphatverbindungen Phosphat auf Glucose. Als phosphatspendende Substrate wurden gefunden ADP, AMP und TPN. Diese Verbindungen (nicht aber frisch gelöstes ATP, siehe unten) ergaben zusammen mit Glucose unter der Katalyse der AGT Glucose-6-

⁺⁺ Herrn Dr. H. U. Bergmeyer, Firma Boehringer, Mannheim, der für diese Arbeit mehrere nicht im Handel zu erwerbende Enzym-Präparate großzügig zur Verfügung stellte, möchte ich hiermit vielmals danken.

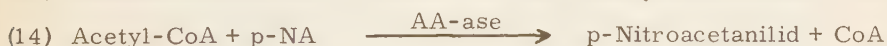
Phosphat, das mit dem oben beschriebenen optischen Test nachzuweisen war.

Eine zuverlässige Bestimmung von Acetat in unbehandeltem Gewebsextrakten schien also mit diesem Test nicht möglich, da verschiedene Phosphatverbindungen Acetat vortäuschen könnten. Dieser Test in Kombination mit einem Destillations- oder Gelfiltrationsschritt zur Abtrennung der Essigsäure von den störenden Phosphatverbindungen würde gegenüber der Sulfanilamidacetylierungs-Methode keinen wesentlichen Vorteil bringen, da die Empfindlichkeit in jedem Fall durch den Abtrennungsschritt begrenzt wird.

Als brauchbar erwies sich dieser katalytische Test aber für Untersuchungen der Acetyl-CoA-Deacylase, des Enzyms, das Acetyl-CoA hydrolytisch spaltet in Acetat und Coenzym A. Der katalytische Test und das Reinigungsverfahren der AGT aus *Aerobacter aergones* werden deswegen weiter unten eingehend beschrieben.

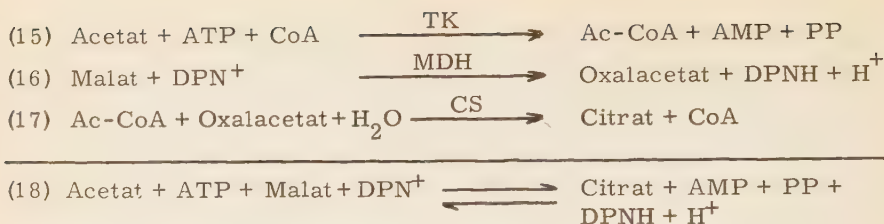
Um einen Überblick über weitere Bemühungen zur enzymatischen Bestimmung freier Essigsäure zu geben, sei noch auf einige andere Methoden hingewiesen, die jedoch nach kürzeren Untersuchungen wieder verlassen wurden.

Die durch Mikrodifffusion oder Gelfiltration abgetrennte Essigsäure kann nach enzymatischer Aktivierung mit ATP und CoA zu Acetyl-CoA durch die Thiokinase (Gl.13) mit Hilfe der Arylaminacetylase (99) auf p-Nitroanilin übertragen werden (Gl.14). Die Acetylierung des Amins geht mit einer Entfärbung des gelben Farbstoffes einher, der optisch bei 405 m μ gemessen wird (Vgl. (105)).



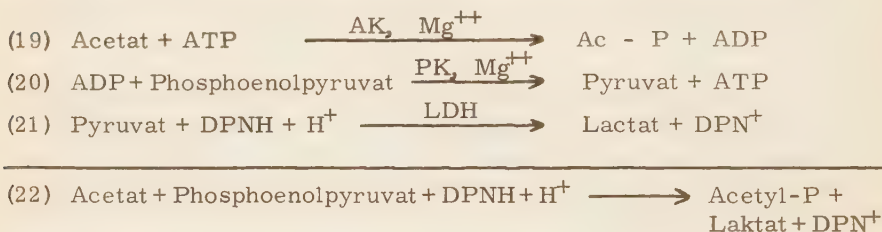
Der Vorteil dieser Methode liegt in dem relativ hohen molaren Extinktionskoeffizienten des p-Nitroanilins ($E_{405} = 10,5 \times 10^6 \text{ cm}^2 / \text{Mol}$) und der direkten optischen Verfolgbarkeit von Reaktion Gl.14. Ihr Nachteil ist die erforderliche Abtrennung der Essigsäure, die umständliche Herstellung und kurze Haltbarkeit der Arylaminacetylase und die mangelnde Spezifität der beiden verwendeten Enzyme.

Essigsäure kann nach Aktivierung zu Acetyl-CoA auch durch Kondensation mit Oxalessigsäure zu Citronensäure durch die Citratsynthase bestimmt werden (105, 110). Als Hilfsreaktion dieser optisch-enzymatischen Bestimmung dient die DPN-abhängige Umwandlung von Malat in Oxalacetat durch die Malatdehydrogenase (94).



Auch durch diese Testanordnung wird die vorherige Isolierung der Essigsäure nicht entbehrlich.

Da Acetyl-Phosphat in tierischem Gewebe nicht vorkommt, sollte die Bestimmung der freien Essigsäure durch Methoden, die anstatt über Acetyl-CoA über Acetyl-Phosphat führen, ohne ihre Isolierung von Acetyl-CoA möglich sein. Der im Folgenden beschriebene Test geht von der enzymatischen Phosphorylierung der Essigsäure durch die Acetokinase aus. Anschließend erfolgt die Bestimmung des durch die Acetokinase entstehenden ADP mit Hilfe der Pyruvatkinase.



In der ersten Reaktion wird Acetat mit ATP durch die Acetokinase zu Acetyl-Phosphat unter ADP-Bildung phosphoryliert (Gl.19). In der zweiten Reaktion wird von Phosphoenolpyruvat das energiereiche Phosphat durch die Pyruvatkinase auf ADP übertragen (Gl.20). Pyruvat kann schließlich im optischen Test durch die Lactatdehydrogenase in Lactat übergeführt werden (Gl.21). Pro Mol Acetat wird ein Mol DPNH_2 zu DPN oxydiert (Gl.22).

Es zeigte sich jedoch, daß selbst beim Einsatz einer Acetatstandardlösung die DPNH_2 Oxydation nicht zum Stillstand kommt, wie nach vollendeter Phosphorylierung des Acetats zu erwarten wäre. Das entstehende Acetyl-Phosphat wird durch die anwesenden für die beiden phosphatübertragenden Reaktionen (Gl.19 und 20) notwendigen Mg^{++} -Ionen spontan in Acetat und Phosphat gespalten (7). Das Acetat tritt erneut in die Reaktion (Gl.19) ein. Somit ist die Bestimmung der Essigsäure durch stöchiometrischen Umsatz auf diese Weise nicht möglich.

Deshalb wurde versucht, durch Erhöhung der Mg^{++} Konzentration und durch Zugabe von Glucose und der oben beschriebenen Acetyl-Phosphat-

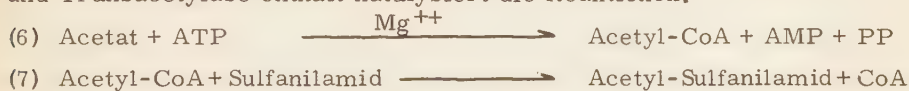
Glucose-6-Phosphotransferase das entstehende Acetyl-Phosphat so rasch wieder zu spalten, daß die ADP-Bildung von katalytischen Mengen an Acetat abhängen sollte. (Eine Weiterreaktion des ADP mit der AGT war wegen der weit größeren Affinität der Pyruvatkinase zu ADP nicht zu erwarten.) Dabei wäre die Bildungsgeschwindigkeit von ADP, meßbar durch die Oxydationsgeschwindigkeit von DPNH_2 , das Maß für die vorhandene Menge Acetat. Dieser Versuch scheiterte an der Unreinheit der verwendeten Enzympräparate, besonders der Acetokinase. Bereits bei der Inkubation von ATP, MgCl_2 , Phosphoenolpyruvat, DPNH_2 , Laktatdehydrogenase und Pyruvatkinase in Tram-Puffer war eine Extinktionsabnahme, also eine DPNH_2 -Oxydation zu messen, die bei Zugabe von Acetokinase noch erheblich zunahm.

Nach diesen Erfahrungen wendete ich mich der Acetatbestimmung nach LUNDQUIST zu, die im Folgenden beschrieben wird:

2. BESTIMMUNG FREIER ESSIGSÄURE NACH F. LUNDQUIST

Prinzip

Ein Enzympräparat aus Taubenlebern das acetataktivierende Enzym und Transacetylase enthält katalysiert die Reaktionen:



Sulfanilamid wird im Überschuß zur enzymatischen Reaktion eingesetzt. Das nicht acetylierte Sulfanilamid wird kolorimetrisch nach BRATTON und MARSHALL (12) bestimmt.

Da durch den enzymatischen Test freie und aktivierte Essigsäure gleichermaßen erfaßt werden und da dieser durch Alkaliionen gestört werden kann, wird die Essigsäure vor ihrer Bestimmung durch Mikrodiffusion nach CONWAY (21) abgetrennt.

Notwendige Reagentien:

1. Natriumsulfat, wasserfrei, acetatfrei, p.a. (Merck, Darmstadt), vor Gebrauch mit 5 % kristallisiertem Natriumsulfat im Mörtel gemischt.
2. Perchlorsäure, p.a. 70 % w/w, Dichte: 1,664.
3. Kalilauge, verd., acetatfrei.
4. Natronlauge, verd., acetatfrei.
5. Salzsäure, verd.,

6. Adenosintriphosphat, ATP, als kristallisiertes Dinatriumsalz, $\text{ATPNa}_2\text{H}_2 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$, Handelspräparat (Fa. Boehringer, Mannheim).
7. Coenzym-A (SH-Form), Reinheit 70-80 %, Handelspräparat (Fa. Boehringer, Mannheim).
8. Sulfanilamid (Fa. Fluka, Buchs, Schweiz).
9. Kaliumcitrat, p.a.
10. Citronensäure, krist., Monohydrat.
11. Magnesiumchlorid, $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$.
12. Cystein-hydrochlorid
13. Tris-hydroxymethyl-aminomethan, reinst, Tris.
14. Trichloressigsäure
15. Natriumnitrit, p.a.
16. Natriumacetat, p.a.
17. Sulfaminsäure, $\text{H}_2\text{NSO}_3\text{H}$.
18. N-naphthylethylendiamin-dihydrochlorid.
19. Enzympräparat aus Taubenleber nach SOODAK (89).

Die Enzymmenge, die einen maximalen Umsatz von Acetat herbeiführt, wird nach jeder Enzymdarstellung neu bestimmt.

Herstellung der Puffer-Coenzym-Sulfanilamid-Lösung

Coenzym-Sulfanilamid-Lösung: 300 mg ATP und 5 mg Coenzym A werden in 5 ml Wasser gelöst. Dazu wird gegeben 3 ml 0,025 M Sulfanilamid, 2 ml 1,0 MK-Citrat und 0,5 ml 0,1 M MgCl_2 . Die Lösung wird in Portionen von genau 1 ml (bzw. 2 ml) in dickwandigen, zugeschmolzenen Reagenzgläsern bei -20°C aufbewahrt. Sie ist so mindestens acht Wochen haltbar.

Puffer-Coenzym-Sulfanilamid-Lösung: Unmittelbar vor Gebrauch wird zu genau 1 ml der Coenzym-Sulfanilamid-Lösung gegeben; 3 ml M Tris-HCl-Puffer, pH 8,1, 0,5 ml 0,5 M Cystein-HCl und 0,5 ml 0,1 M MgCl_2 . Die Lösung wird kurz geschüttelt und während des Gebrauchs im Eisbad aufbewahrt.

Arbeitsweise

Die Analyse gliedert sich in vier Stufen:

- a) Extraktion des Untersuchungsmaterials,
- b) Abtrennung der Essigsäure durch Mikrodifusion,
- c) enzymatische Reaktion,
- d) Sulfanilamidbestimmung.

Da die Reaktionen nicht vollständig ablaufen, sind Standard-Acetat-Lösungen mit zu analysieren. Ferner ist ein Reagentienblindwert notwendig.

a) Untersuchungsmaterial und Extraktion

Als Versuchstiere dienten überwiegend männliche Albinoratten (Sprague-Dawley-Stamm, Lieferant W. Gassner, München-Ottobrunn) mit einem ungefähren Körpergewicht von 200 g. Die Tiere erhielten, wenn nicht anders angegeben, Standardmischfutter: (Altromin R, Firma Attroge, Laage/Lippe) und Wasser ad libitum.

Zur Organentnahme wurde in leichter Äthernarkose die Bauchhöhle eröffnet und die Organe unter Schonung des ernährenden Gefäßsystems freipräpariert. Dieses wurde durchtrennt und die Organe sofort in flüssige Luft geworfen, worin sie bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt blieben.

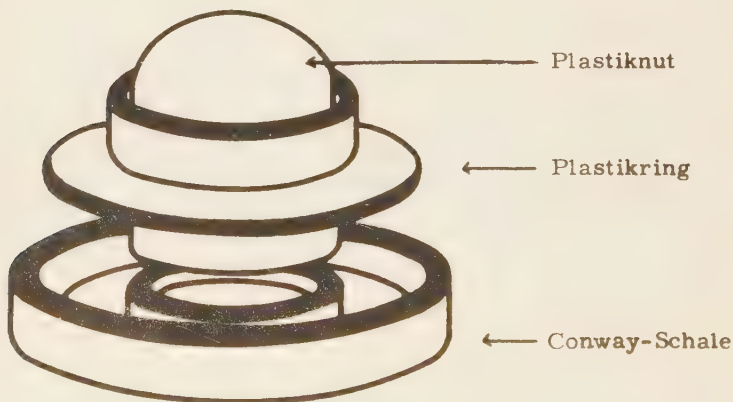
Das tiefgefrorene Gewebe wurde im Kühlraum schnell abgewogen und mit dem zweifachen Volumen 4 % Perchlorsäure in einem Potter-Elvehjem-Homogenisator (45) homogenisiert. Mit 1 Vol 4 % Perchlorsäure wurde der Homogenisator nachgespült. Bei 12000 U/min wurde das Homogenat 20 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde umgegossen, der Rückstand mit 1 Vol 3 % Perchlorsäure gewaschen. Die vereinigten Überstände (3 % perchlorsäure) wurden mit 6 n Natronlauge und 1 Tropfen 0,04 % wässrige Thymolblaulösung als Indikator auf pH 3-5 (Umschlag von rot zu gelb) eingestellt und anschließend mit Citrat-Puffer (0,5 M, pH = 3) gepuffert. (Diese Neutralisation und anschließende Pufferung, wie sie in der Originalbeschreibung der Bestimmungsmethode gefordert wird (60), bringt jedoch keinen Vorteil. Bei späteren Untersuchungen wurde direkt 3 % perchlorsaurer Extrakt eingesetzt.)

Die Blutentnahme erfolgte durch Punktion entweder der vena cava inferior (bei eröffnetem Abdomen) oder durch Herzpunktion. 1 Vol in einer Spritze vorgelegte Natrium-Citrat-Lösung (3,8 %) wurde auf 5 Vol aufgezogen. Zur Herzpunktion der narkotisierten Tiere wurde parasternal eingestochen. (Die Tiere überstanden eine Entnahme von ca. 2 ml Blut gut.) Das Citratblut wurde im Kühlraum zentrifugiert. Das abgehobene Plasma bis zur Extraktion im Eisbad aufbewahrt. 1 Vol Plasma wurde mit 1 Vol 6 % Perchlorsäure enteiweißt. Nach kräftigem Schütteln wurde zentrifugiert. Der Rückstand wurde mit 1/2 Vol 3 % Perchlorsäure gewaschen. Beide vereinigten Überstände wurden titriert und gepuffert wie oben beschrieben.

b.) Abtrennung der Essigsäure durch Mikrodifffusion

In einer Reibschale wird wasserfreies Natriumsulfat mit 5 % kristallisiertem Natriumsulfat sorgfältig verrieben. 5 g dieses Pulvers werden gleichmäßig in der äußeren Kammer der Mikrodifffusion-Schalen (Durchmesser: 75 mm, Höhe: 13 mm) nach CONWAY (Fa. Rosenthal) (vergleiche Skizze Seite 18 unten) verteilt.

und mit Hilfe eines Plastikringes, der genau in die äußere Kammer paßt, leicht festgedrückt. Um die Auffüllung der äußeren Kammer zu erleichtern und um die Verschmutzung der inneren Kammer mit Natriumsulfat zu verhindern, wird während des Auffüllens ein Plastikhut konisch auf die innere Kammer aufgesetzt. Die gefüllten CONWAY-Schalen werden in den Kühlraum gestellt. Nach 40-60 Minuten wird 1 ml des eisgekühlten Perchlorsäure-Extraktes gleichmäßig auf die Natriumsulfat-Schicht aufgetropft. In die mittlere Kammer der CONWAY-Schale wird ein Teilerchen aus Plexiglas (Durchmesser: außen 33 mm, innen: 30 mm, Höhe: außen 5 mm, innen: 3,5 mm), in das 0,6 ml 0,033 M Kalilauge einpipettiert wurde, gestellt. Die Conway-Schalen werden mit einem Glasscheibchen verschlossen, das auf den Rand der Schale aufgedrückt wird, auf den mit Hilfe einer Glasspritze eine Mischung aus 3 Vol flüssigem und 1 Vol festem Paraffin aufgebracht worden war. Die verschlossenen Schalen bleiben noch 40-60 Minuten im Kühlraum stehen und werden dann bei Zimmertemperatur (20-25°C) abgestellt. Durch die Kühlung der Conway-Schalen im Kühlraum, sowie durch die Zugabe von 5 % kristallisiertem Natriumsulfat wird eine beschleunigte Kristallisation des Natriumsulfats beabsichtigt. Bei Routineuntersuchungen blieben die Schalen 36-40 Stunden verschlossen. Nach dieser Zeit waren im Durchschnitt 85 % der eingesetzten Essigsäure in die vorgelegte Kalilauge überdestilliert.



c) Enzymatische Reaktion

Alle Pipettierungen werden mit λ -Pipetten durchgeführt. Die mit Kalilauge gefüllten Plexiglastellerchen werden aus den Conway-Schalen genommen. Um die Kalilauge bis zur Trockene einzudampfen, werden die Tellerchen in einer großen Kristallisierschale auf einem Wasserbad (95°C) 30 min. erhitzt (Dabei wird Acetacetat zerstört.)

Nach dem Abkühlen wird in die trockenen Tellerchen einpipettiert:

0,2 ml 0,1 M Salzsäure

0,25 ml Coenzym-Sulfanilamid-Puffer-Lösung (frisch bereitet)

Der Tellerinhalt wird mit einem Glasstab gut gemischt.

0,2 ml werden entnommen und in ein mit einem Glasstopfen verschließbares Zentrifugenröhrchen gebracht. Dazu werden

0,15 - 0,2 ml (entsprechend der Aktivität) Enzymlösung pipettiert. Das Röhrchen wird 20 sec mit Stickstoff begast, verschlossen und 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die Inkubationslösung wird mit 1,0 ml 5 % Trichloressigsäure enteiweißt und 10 min zentrifugiert.

d) Sulfanilamid-Reaktion

Das nicht umgesetzte Sulfanilamid wird nach BRATTON und MARSHALL (12) bestimmt. Alle Pipettierungen müssen sehr genau durchgeführt werden. In ein Reagenzglas (10 ml) wird gegeben:

4,5 ml 0,9 N Salzsäure

0,5 ml enteiweißter Überstand des Reaktionsansatzes.

Dazu wird nacheinander pipettiert, wobei nach jedem Schritt das Glas kräftig geschüttelt und danach einige Minuten stehen gelassen wird:

0,5 ml 0,1 % Natriumnitrit (Lösung frisch zubereitet)

0,5 ml 0,5 % Sulfaminsäure

0,5 ml 0,1 % N-naphthylethylendiamin-dihydrochlorid.

Die auftretende rote Farbe wird bei $546\text{ m}\mu$ in 1 cm Kuvetten gemessen.

Blind- und Standardwerte

Als Blindprobe wurde 1 ml 3 % Perchlorsäure zur Mikrodifffusion eingesetzt. Als Standard-Acetate-Lösung diente eine eingewogene 1 mM Na-Acetate-Lösung, von der zur Aufstellung der Eichkurve 0,1, 0,2

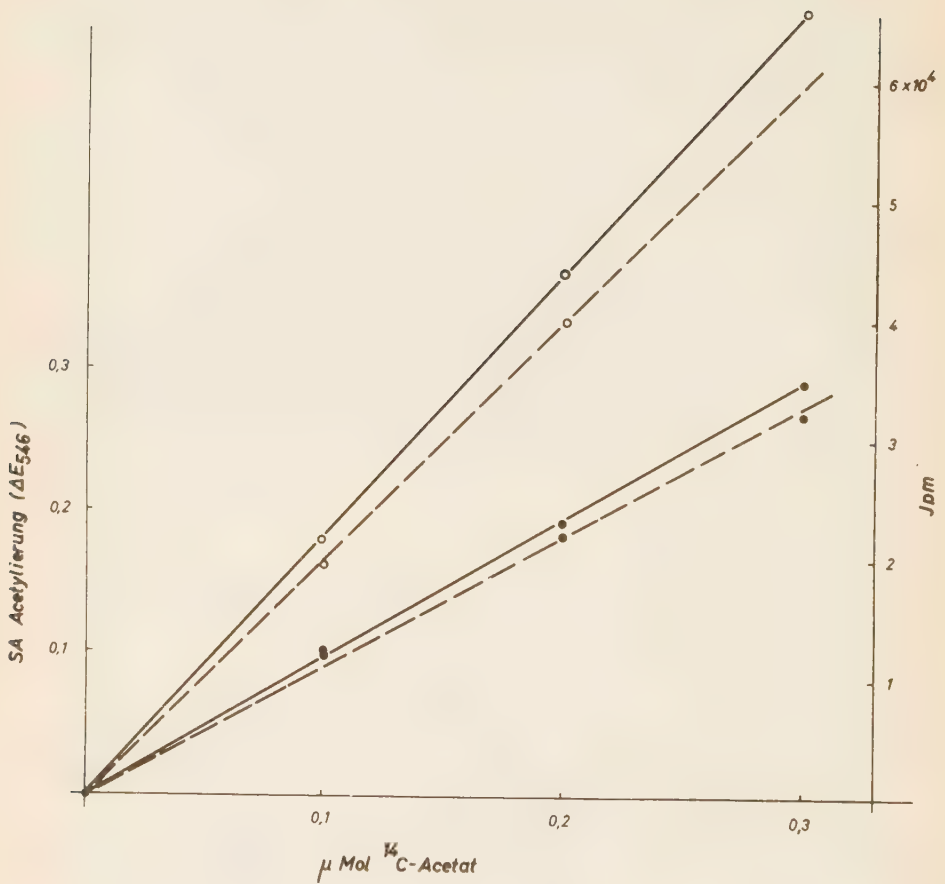


ABBILDUNG 1

Eichkurve der Acetatbestimmung:

Steigende Mengen ^{14}C -Acetat wurden der Mikrodifffusion unterzogen und sowohl enzymatisch ($\bullet\text{---}\bullet$) als auch auf Radioaktivität ($\circ\text{---}\circ$) getestet. Die ausgezogenen Kurven zeigen die entsprechenden Ergebnisse ohne Mikrodifffusion.

und 0,3 ml mit jeweils 0,5 ml 6 %ige Perchlorsäure und Wasser ad 1,0 ml eingesetzt wurden.

Zur Kontrolle der Mikrodifffusion wurde an Stelle von kaltem Acetat radioaktives ^{14}C -Acetat verwendet und durch den beschriebenen enzymatischen Test wie auch durch einen Radioaktivitätstest bestimmt. Von demselben Destillat wurde Acetat zum enzymatischen und zum Radioaktivitätstest eingesetzt (jeweils 0,2 ml des Lösungsvolumens im Plexiglas-Tellerchen). Die Radioaktivität wurde im Scintillationszähler der Firma Packard gemessen.

Eine solche Eichkurve zeigt Abbildung 1. Ein Rückbestimmungsversuch von zugesetztem Acetat ist in Tabelle 1 dargestellt.

TABELLE 1

Rückbestimmung von zugesetztem Acetat:

In Versuch 1 und 2 wurde ^{14}C -Acetat in den angegebenen Mengen zu Rattenleber, in Versuch 3 unmarkiertes Acetat zu Blutplasma -in beiden Fällen vor Enteiweißung- zugesetzt.

Versuch	Acetatgehalt	^{14}C -Acetat zugesetzt ¹⁾		Acetat gefunden		% der zugesetzten Menge	
Nr.	$\mu\text{Mol/g}$	$\mu\text{Mol/g}$	(lpm)	$\mu\text{Mol/g}$	(lpm)	enzym.	als ^{14}C Acetat
1	0,257	0,727	$10,8 \times 10^4$	0,92	$10,4 \times 10^4$	92	96
2	0,257	1,5	$22,7 \times 10^4$	1,68	$21,7 \times 10^4$	94	95
3 ²⁾	0,235	0,375	-	0,60	-	97	-

1) Geeicht nach vorausgehender Mikrodifffusion

2) Die Werte bedeuten $\mu\text{Mol/ml}$ Plasma (Ratte)

Störungen

Nach SOODAK (89) stören Formiat und Pyruvat die Bestimmung nicht. Propionat gibt etwa 0,7 %, Butyrat 1,3 % und Valerianat 0,4 % der Farbänderung, die man durch die äquivalente Menge Acetat erhält. Diese Substanzen kommen deswegen als Fehlerquellen praktisch nicht in Betracht. Acetessigsäure reagiert mit dem Taubenleberenzym, diffundiert aber wesentlich langsamer über und wird zudem beim Erhitzen des Destillates zerstört, so daß selbst Konzentrationen von 100 mg je ml Plasma die Acetatbestimmung nicht stören. Acetyl-CoA ist im Sauren relativ stabil und nicht flüchtig, es wird deshalb nicht erfaßt. Acetadenyl-

säure dagegen ist labil und wird bei pH 7 rasch hydrolysiert. Sie wird daher wahrscheinlich als freies Acetat mitbestimmt. Jedoch dürfte sie in tierischen Geweben kaum in nennenswerten Mengen vorkommen.

Herstellung des Taubenleberenzym

Als Enzympräparat für die Sulfanilamidacetylierung dient ein angereicherter Extrakt aus Taubenleber-Acetonpulver. Die Aktivität sowohl des acetataktivierenden Enzyms, der Acetat-Thiokinase, wie des Sulfanilamid-acetylierenden Enzyms, der Sulfanilamid-Acetylase, fällt aus dem Rohextrakt zwischen 40-70 % Ammonsulfat-Sättigung. Seine Herstellung erfolgte im wesentlichen nach den Angaben von SOODAK (89). Die zum Test erforderliche Menge an Enzym wird bestimmt, indem eine Untersuchungsreihe mit konstanter Menge Acetat und steigenden Mengen Enzym durchgeführt wird. Da das Enzym geringe Spuren von Acetat enthalten kann, müssen Nullwerte mit untersucht werden, die Enzym und kein Acetat zugesetzt erhalten. Abbildung 2 zeigt eine so durchgeführte Aktivitätsbestimmung.

II. METHODEN ZUR BESTIMMUNG DER ACETYL-CoA-DEACYLASE

1. ÜBERSICHT

Die physiologisch bedeutsamste Ausgangssubstanz zur Bildung freier Essigsäure im Tierkörper (Wiederkäuer nehmen eine gewisse Sonderstellung ein) dürfte wohl die aktivierte Essigsäure sein, der Weg ihrer Entstehung die enzymatisch hydrolytische Spaltung des Acetyl-Coenzym A durch die Acetyl-CoA-Deacylase (Gl. 23).



Dieses Enzym wurde zum ersten Mal von GERGELY 1952 beschrieben (32). In der vorliegenden Arbeit wird Vorkommen, Aktivität und Substrataffinität dieses Enzyms eingehender untersucht. Dazu wurde roher dialysierter Gewebsextrakt mit Acetyl-CoA inkubiert und das Auftreten von freiem Acetat bzw. der freien Sulfhydryl-Gruppen des Coenzym-A zeitlich verfolgt.

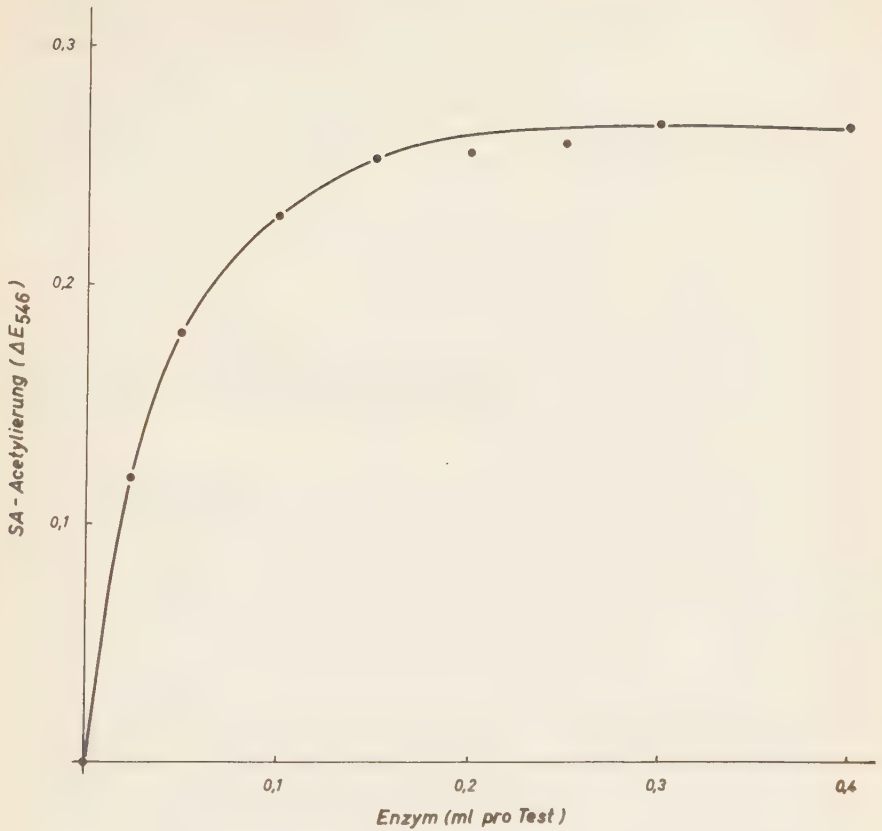


ABBILDUNG 2

Aktivitätsbestimmung des Taubenleberenzym:

0,2 μ Mol Acetat (0,1 ml einer 2 mM Lösung), Puffer-Coenzym-Sulfanilamid-Lösung (0,25 ml) und steigende Mengen Enzym und Wasser (ad 0,75 ml) wurden unter N_2 -Atmosphäre 60 Minuten bei $37^\circ C$ inkubiert. Die Reaktion wurde mit 5 % Trichloressigsäure gestoppt. Die kolorimetrische Bestimmung von Sulfanilamid erfolgte wie oben angegeben.

Der von LUNDQUIST angegebene Acetatbestimmungstest erwies sich dazu wegen der zu geringen Empfindlichkeit als ungeeignet. Das Substrat der Acetyl-CoA-Deacylase, Acetyl-CoA, ist nur schwer völlig acetatfrei herzustellen. Bei Einsatz der Sättigungskonzentration von mindestens 0,3 mM Acetyl-CoA (mit einer Verunreinigung von wenigstens 0,05 mM freien Acetats) ist der von einem rohen Acetyl-CoA-Deacylase-Präparat zu erwartende Umsatz von 0,010-0,015 $\mu\text{Mol pro ml}$ Testvolumen wegen des etwa gleichhohen absoluten Fehlers der Acetatbestimmung nicht sicher zu erfassen.

Als brauchbar erwies sich der schon früher erwähnte (vergl. S.12 f) katalytische Test zur Acetatbestimmung mit Hilfe der Acetyl-P-Glucose-6-Phosphotransferase. Mit diesem Test wurde der größte Teil der im Folgenden beschriebenen Ergebnisse über die Acetyl-CoA-Deacylase gewonnen. Durch ihn wird der sichere Beweis erbracht, daß durch tierische Gewebe aus Acetyl-CoA freie Essigsäure gebildet werden kann. Sehr vorteilhaft ist die große Empfindlichkeit und die verhältnismäßig schnelle Ausführung des Testes.

Die Bestimmung der Acetyl-CoA-Deacylase über die Bestimmung der Sulfhydryl-Gruppen des freiwerdenden Coenzym A (CoA-SH) erfolgte mit dem Dichlorphenolindophenol-Test (DPI-Test (69)). Die im Acetyl-CoA thioesterartig gebundene Sulfhydryl-Gruppe des Coenzym A (CoA-S-Acetat) wird bei dessen hydrolytischer Spaltung frei. Durch die SH-Gruppe wird Dichlorphenolindolphenol, ein blauer Farbstoff, unter Entfärbung reduziert. Das Auftreten von -SH kann direkt optisch durch Abnahme der Extinktion bei 578 $\text{m}\mu$ verfolgt werden. Darin, in der leichten und schnellen Durchführung und in der durch den molaren Extinktionskoeffizienten des DPI ($E_{578} = 26,5 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol}$) bedingten großen Empfindlichkeit liegt der Vorteil dieser Methode. Durch sie wird jedoch nicht der Beweis erbracht, daß neben dem freien Coenzym A auch tatsächlich freie Essigsäure entsteht. Die Thiolase z. B., das Enzym, das zwei Moleküle Acetyl-CoA zu Acetacetyl-CoA kondensiert unter Bildung von freiem Coenzym A (Gl. 24), würde unter den gleichen Testbedingungen ebenfalls zu einer Entfärbung des DPI führen. Das Gleiche gälte auch für den Fall der Weiterreaktion von Acetacetyl-CoA mit Acetyl-CoA zu HMG-CoA und Coenzym A durch das HMG-CoA kondensierende Enzym (Gl. 25).



Möglicherweise führte die Überlagerung der Wirkung der Acetyl-CoA-Deacylase, der Thiolase, und des HMG-CoA kondensierenden Enzyms Enzyme, die in rohem Leberextrakt vorhanden sind, dazu, daß bei Substratsättigungskurven der Acetyl-CoA-Deacylase in Leberextrakt, die mit dem DPI-Test ermittelt wurden, keine vollständige Sättigung, also

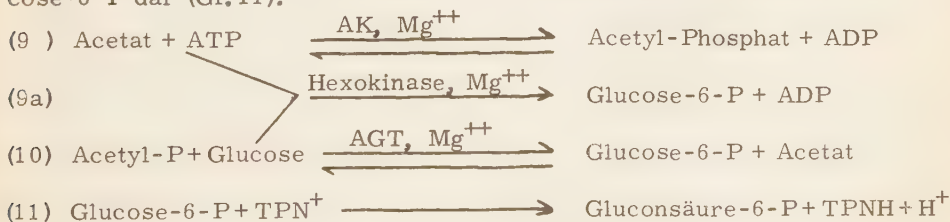
keine Maximalgeschwindigkeit der DPI-Entfärbung zu erzielen war. Im Gegensatz zu Substratsättigungskurven, die mit dem katalytischen Acetatbestimmungstest erhalten wurden (siehe Abbildung 26, Seite 75) war bei Acetyl-CoA-Konzentrationen von mehr als 4 mM kein Plateau erreicht. Vielmehr nahm die Reaktionsgeschwindigkeit, also die Geschwindigkeit der DPI-Entfärbung, bei größeren Konzentrationen linear mit dem Acetyl-CoA zu. Abgesehen von dieser Ausnahme entsprechen jedoch die Ergebnisse, die mit beiden Tests erzielt wurden, im wesentlichen einander.

2. BESTIMMUNG DES NACH DEACYLASE-SPALTUNG FREIGESETZTEN ACETATS MIT DEM KATALYTISCHEN TEST

Prinzip

Dialysierter Gewebsextrakt wird mit Acetyl-CoA bei 37 °C inkubiert. Zum gewünschten Zeitpunkt wird die Reaktion durch Zugabe von verdünnter Perchlorsäure gestoppt. Im enteiweißten, mit Kalilauge neutralisierten Extrakt wird Acetat mit Hilfe des katalytischen Tests quantitativ bestimmt. Die Aktivität der Acetyl-CoA-Deacylase ergibt sich aus der Menge des freigesetzten Acetats pro Zeiteinheit und Enzymkonzentration.

Der katalytische Test zur Bestimmung der freien Essigsäure beruht auf der Kombination von drei enzymatischen Reaktionen (vergl. auch Seite 12). In der ersten entsteht aus Acetat und ATP mit Hilfe der Acetokinase Acetyl-Phosphat und ADP (Gl. 9); die zweite Reaktion (Gl. 10) besteht in der Übertragung des Phosphats von Acetyl-Phosphat auf Glucose unter Bildung von Glucose-6-Phosphat und Freisetzung von Acetat, das erneut in die erste Reaktion (Gl. 9) eintreten kann. Die dritte Reaktion stellt die Indikatorreaktion zur optischen Bestimmung der entstandenen Glucose-6-P dar (Gl. 11).



Die Konzentration des vorhandenen Acetats ist geschwindigkeitsbestimmend für die Bildung von Glucose-6-Phosphat und damit von TPNH_2 , was durch die Extinktionszunahme bei 344 m μ direkt optisch meßbar wird.

Die Voraussetzung dieses kombinierten Testes ist die vollständige Reinheit der drei Enzyme an Hexokinase. Die von diesem Enzym katalysierte Reaktion, die direkte Phosphorylierung der Glucose mit ATP (Gl. 9a) würde eine Umgehung der ersten und zweiten Reaktion bedeuten.

Notwendige Reagentien

1. Tris-hydroxymethyl-aminomethan, reinst, Tris
2. Acetyl-CoA, hergestellt aus Essigsäureanhydrid und CoA nach SIMON et al. (85), arm an freier Essigsäure (s.unten)
3. Perchlorsäure, p.a., 70 % w/w, Dichte: 1,664
4. Kalilauge, 10 M
5. Methylorange, 0,04 % wässrige Lsg.
6. Glucose, p.a.
7. Magnesiumchlorid, p.a., $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
8. Triphosphopyridinnucleotid, TPN (Handelspräparat, Fa.Boehringer)
9. Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (Handelspräparat Fa.Boehringer, 5 mg pro ml).
10. Acetyl-Phosphat-Glucose-6-Phosphotransferase, hergestellt aus *Aerobacter aerogenes* (siehe unten)
11. Acetokinase (Fa.Boehringer, 10 mg pro ml, vergleiche S.12 Fußnote)

Herstellung, Reinigung und Standardisierung der Acetyl-CoA-Lösung

Acetyl-CoA wird hergestellt aus Essigsäureanhydrid und Coenzym A wie an anderer Stelle beschrieben (85). Durch die dort angegebene Ätherperforation des sauren Rohpräparates wird der größte Teil an vorhandener freier Essigsäure entfernt. Diese Reinigung ist jedoch nicht ausreichend. Die Menge des während der Inkubation von Gewebsextrakten aus Acetyl-CoA entstehenden Acetats ist zu gering im Verhältnis zu dem als Verunreinigung eingeschleppten Acetat.

Eine befriedigende Abtrennung der Essigsäure vom Acetyl-CoA erbringt die Gelfiltration mit Sephadex Gel, G-25 (Fa. Pharmacia, Upsala). Die um den Coenzym A Rest größeren Acetyl-CoA Moleküle durchfließen eine Gel-Säule schneller als die kleineren Acetat-Moleküle. Filtriert wird mit dest. Wasser. Das Auftreten des Acetyl-CoA wird durch Messung der Lichtadsorption bei 230 m μ oder 260 m μ bestimmt (22). Zum Nachweis der freien Essigsäure wird vor der Gelfiltration wenig radioaktiv markiertes ^{14}C -Acetat zugesetzt und dessen Auftreten durch Radioaktivitätsmessung bestimmt. Das Ergebnis einer Gelfiltration zeigt Abbildung 3.

Die Standardisierung der so gereinigten Acetyl-CoA-Lösung erfolgte mit Hilfe eines kombinierten Dichlorphenolindophenol-Tests (112). Acetyl-CoA wird mit Oxalacetat und Citratsynthase (Handelspräparat, Fa.Boehringer) zu Citrat kondensiert unter Freisetzung von CoA-SH (Vergl. Gl.17,

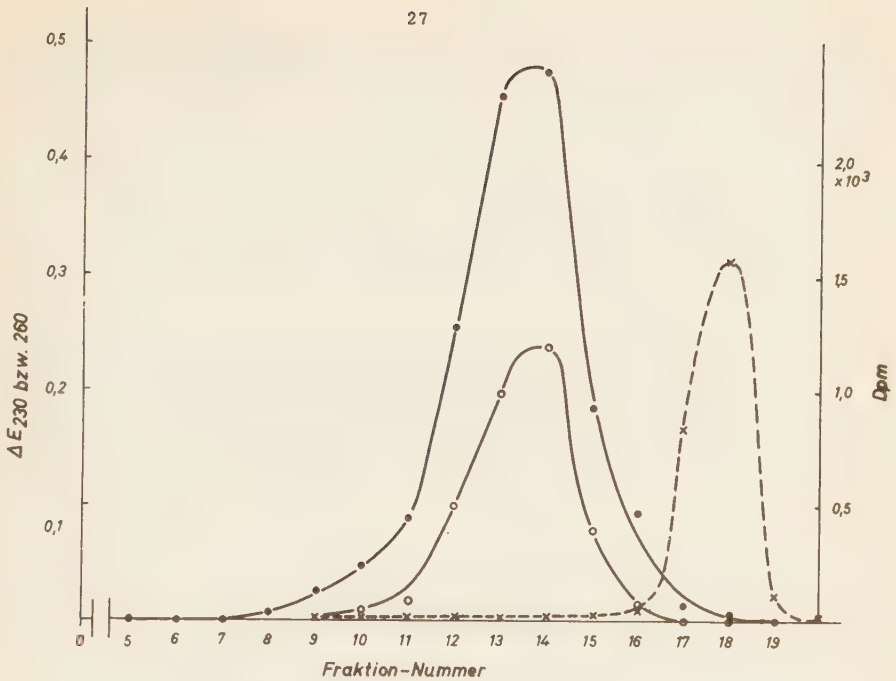


ABBILDUNG 3

Trennung von Acetyl-Coenzym A und Acetat durch Gel-Filtration:

Auf eine Sephadex G-25-Säule (Höhe 60 cm, Durchmesser: 1 cm) wird 1 ml einer ca. 6 mM wässrigen Acetyl-Coenzym A-Lösung aufgetragen. Das darin als Verunreinigung enthaltene freie Acetat war durch Zusatz von ^{14}C -Acetat (0,01 ml einer 1 mM Lösung mit $1,67 \times 10^6$ IPM/ml) markiert worden. Filtriert wird mit destilliertem Wasser. Das Filtrat wird in Fraktionen von ca. 2 ml gesammelt. Das Auftreten des Acetyl-CoA wird bestimmt durch Messung der Lichtadsorption bei 230 $\text{m}\mu$ (●—●) und 260 $\text{m}\mu$ (○—○). (Filtrat 1:30 verdünnt, 10 mm Schichtdicke, Spektrometer der Fa. Zeiß), das Auftreten der freien Essigsäure durch Radioaktivitätsmessung (x---x) (0,15 ml Filtrat werden in 10 ml Scintillationsflüssigkeit nach BRAY (14) im Scintillationszähler, Fa. Packard Instrumental Company, Illinois, La Grange, gezählt.)

Seite 14). Durch die SH-Gruppe wird Dichlorphenolindolphenol reduktiv entfärbt. Die Reaktion verläuft praktisch quantitativ nach der Seite von Citrat (Molarer Extinktionskoeffizient des DPI: $E_{578} = 26,5 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol}$).

Testansatz für die Acetyl-CoA-Bestimmung:

In eine 1 cm Kuvette wird nacheinander gegeben:

0,015 ml 0,05 % DPI,

1,8 ml 0,2 M Tris-HCl, pH = 7,4,

0,05 ml 0,1 M K-Oxalacetat, pH = 7,4,

Acetyl-CoA.

Nach einer kurzen Vorinkubation, bei der das als Verunreinigung vorhandene freie CoA mit DPI unter Oxydation abreagiert, wird 0,01 ml Citratsynthase (1:20 verdünntes Handelspräparat) zugegeben. Die Extinktionsabnahme ergibt die Menge des eingesetzten Acetyl-CoA.

Aktivitätsbestimmung der Acetyl-CoA Deacylase

Die Aktivitätsbestimmung der Acetyl-CoA-Deacylase setzt sich zusammen aus drei Arbeitsgängen: a) Herstellung und Dialyse des Gewebsextraktes, b) Inkubation mit Acetyl-CoA, c) Bestimmung der Essigsäure.

Zwei Blindwerte sind notwendig: Eine Acetatbestimmung vor Beginn der Inkubation, da das wie oben beschrieben gereinigte Acetyl-CoA Präparat immer noch bis zu 10 Mol % freies Acetat enthalten kann, und eine Acetatbestimmung in einer nur mit Tris-Puffer inkubierten Acetyl-CoA Lösung, da bei den Inkubationsbedingungen eine geringe Menge Acetyl-CoA spontan hydrolytisch gespalten werden kann (22).

a) Untersuchungsmaterial und Extraktion

Die Versuchstiere waren männliche Albinoratten (vergl. S.17). Die Organe wurden entnommen nach Dekapitation der Tiere und bis zur Extraktion in flüssiger Luft aufbewahrt. Sie wurden mit dem zehnfachen Volumen 0,1 M Tris-HCl-Puffer, pH = 7,4, im Ultraturrax (TP 17/2, Fa. Janke u. Kunkel KG, Staufen i. Br.) eine Minute aufgeschlossen. Das Homogenat wurde bei 100 000 g eine Stunde zentrifugiert, der klare Überstand abgehoben und 6 Stunden gegen 0,1 M Tris Puffer, pH = 7,4, dialysiert. Danach wurde sofort auf Enzymaktivität getestet.

b) Inkubation mit Acetyl-CoA

In ein 10 ml Zentrifugenglas wird nacheinander pipettiert:

0,25 ml Acetyl-CoA (ca. 3,0 mM),
 1 ml 0,1 M Tris-HCl-Puffer, pH = 7,4,
 das Gläschen wird einige Minuten bei 37 °C vorinkubiert. Dann wird
 dazugegeben

0,25 ml Gewebsextrakt, (maximal 5 mg Protein/ml).
 Nach einer Inkubationsdauer von 0, 2, 4 und 8 min. werden jeweils
 0,25 ml der Inkubationslösung in 10 ml Zentrifugengläschen über-
 tragen, in die jeweils
 1,25 ml 4 % Perchlorsäure vorgelegt worden waren.

c) Bestimmung der Essigsäure

Die enteiweißte perchlorsaure Inkubationslösung wird mit 10 N Kalilau-
 ge und 0,01 ml 0,04 % wässrige Methylorange als Indikator bis zum
 Umschlag titriert. Dabei ist peinlichst darauf zu achten, daß der Neu-
 tralpunkt nicht überschritten wird, da sonst Acetyl-CoA hydrolytisch
 in Acetat und CoA zerfällt (22).

In eine bei 37 °C vorinkubierte 1 cm Schmalkuvette (OS, Fa. Eppendorf,
 Hamburg) wird nacheinander pipettiert:

0,5 ml neutralisierte Inkubationslösung,
 0,1 ml 1 M Tris-HCl-Puffer, pH 7,55,
 0,01 ml 0,5 M Glucose,
 0,01 ml 0,5 M $MgCl_2$,
 0,01 ml 0,05 M TPN,
 0,01 ml 0,1 M ATP,
 0,02 ml Glucose-6-P-Dehydrogenase (Handelspräparat,
 5 mg/ml 1:25 mit H_2O verdünnt).
 Acetyl-P-G-6-Phosphotransferase (0,02 ml bei wie unten
 definierter Aktivität von 2; 8).

Nach einer Vorinkubation von 8-10 min. wird zugegeben

0,01 ml Acetokinase (Präparat der Fa. Boehringer, 10 mg/ml,
 1:10 verdünnt)

Der zeitliche Verlauf der Extinction bei 334 $m\mu$ wird mit einem Direkt-
 schreiber aufgezeichnet.

Eichkurve der Acetatbestimmung mit dem katalytischen
 Test

Vorgegangen wird wie oben beschrieben. Statt der neutralisierten Inkuba-
 tionslösung wird eine in ihrer Zusammensetzung dieser entsprechende
 Acetatlösung eingesetzt.

Die Originalwiedergabe einer mit dem Direktschreiber aufgezeichneten Eich-
 kurve zeigt Abbildung 4. Vier Werte wurden durch einen automatischen Ku-
 vettenwechsler gleichzeitig bestimmt. Vergleiche auch Abbildung 5.

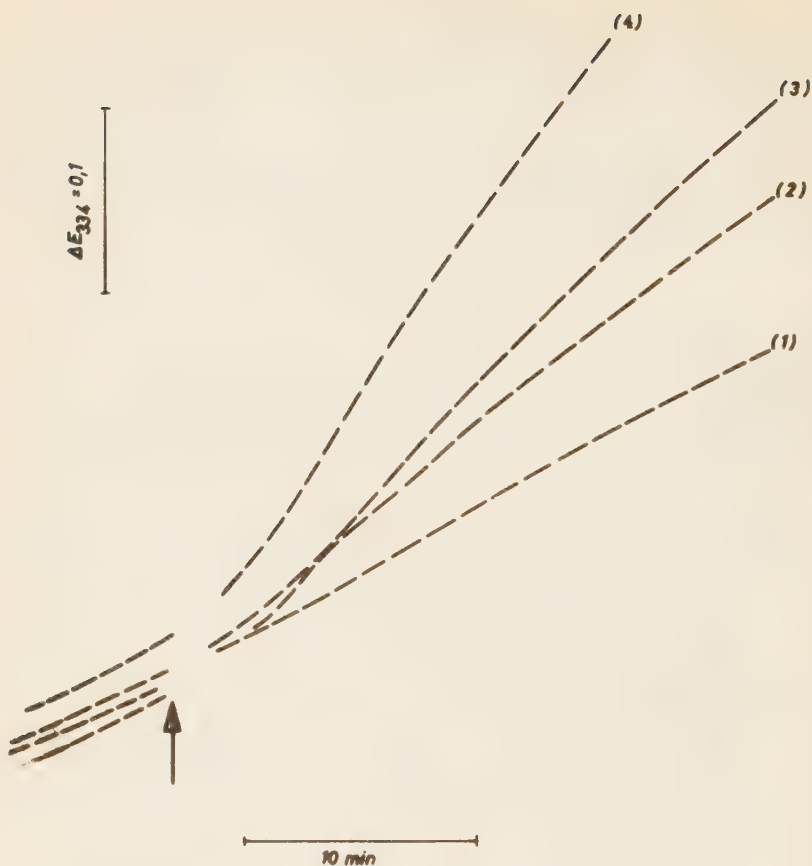


ABBILDUNG 4

Originalwiedergabe der Acetatbestimmung mit dem katalytischen Test:

Neutralisierte 3 % Perchlorsäurelösungen mit steigenden Mengen Acetat wurden zur Bestimmung in vier automatisch wechselbaren Kuvetten eingesetzt. In den jeweils 0,6 ml Testvolumen waren 0,000 μMol (1), 0,007 μMol (2), 0,015 μMol (3) und 0,03 μMol (4) Acetat enthalten. Nach kurzer Vorinkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von Acetokinase (Pfeil) gestartet.

Berechnung

Der Wert $\Delta E/\Delta t$ nach Zugabe von Acetokinase minus $\Delta E/\Delta t$ vor AK-Zugabe ist proportional der vorliegenden Acetatkonzentration (Abbildung 5). Der Proportionalitätsfaktor ($\Delta E/\Delta t \times$ Acetatkonzentration) ist durch eine täglich mitzubestimmende Eichkurve zu ermitteln.

Beispiel

Auf Deacylase-Aktivität getestet wurde Lebermitochondrien-Extrakt, 5,08 mg Protein/ml. Die Konzentration des zugegebenen Acetyl-CoA war 3,72 mM. Vorgegangen wurde genau wie oben angegeben. Das Ergebnis der Acetatbestimmung zeigt Tabelle 2.

TABELLE 2

Vergl. laufenden Text

Inkubationszeit (Min.)	0	2	4	8
Acetat (μ Mol/ml Testlsg.	0,014	0,044	0,071	0,124

Daraus ergibt sich eine Acetatfreisetzung von 0,018 μ Mol pro min und ml Inkubationslösung. Die Deacylase-Aktivität der untersuchten Proteinslösung ist somit: $A_{370C} = 0,021$ Mol/min x mg Protein. Zur Kontrolle wurde ein Ansatz mitinkubiert, der anstatt des Leberextraktes nur Tris-Puffer enthielt. Dabei konnte keine Bildung von Essigsäure aus Acetyl-CoA nachgewiesen werden.

Störungen

Wie bereits auf Seite 13 erwähnt, ist der katalytische Test keine geeignete Methode zum Nachweis von Acetat in Gewebsextrakten. Im vorliegenden Fall wird jedoch durch Dialyse der zu untersuchenden Gewebsextrakte die Konzentration störender niedermolekularer Verbindungen so weit erniedrigt, daß diese als Fehlerquellen nicht mehr in Betracht kommen (Vergleiche auch Seite 12).

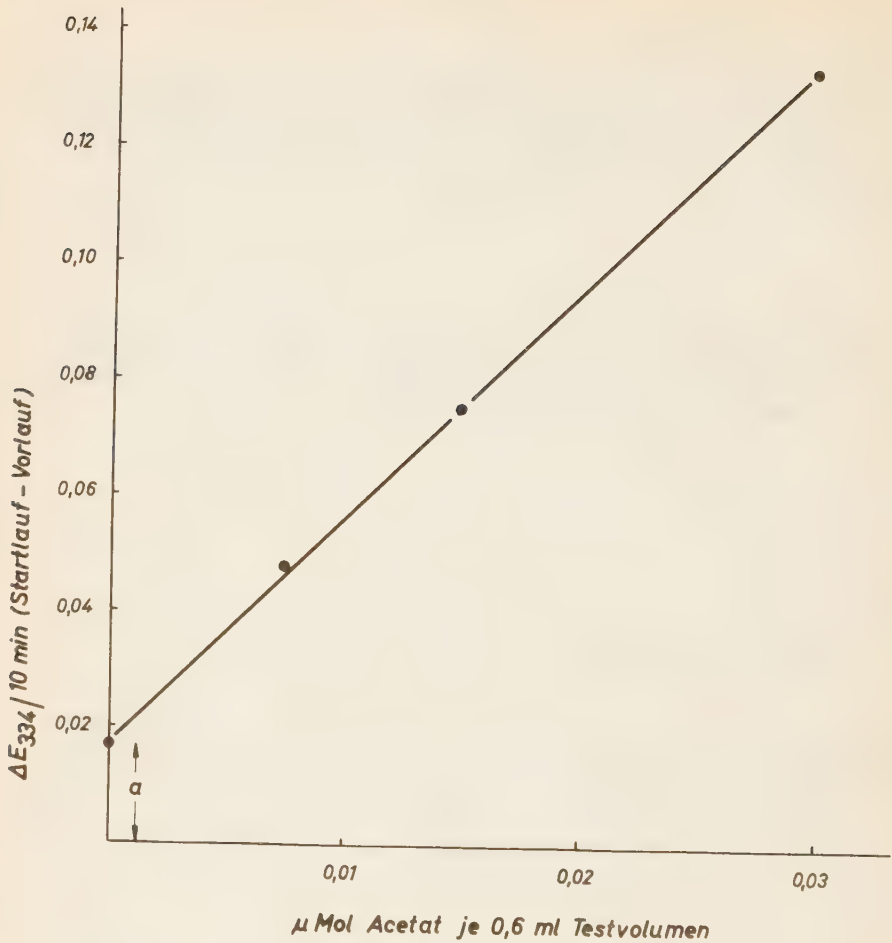


ABBILDUNG 5

Eichkurve der Acetatbestimmung durch den katalytischen Test

Die Eichkurve entspricht den Werten der Abbildung 4. Auf der Ordinate ist aufgetragen die Differenz $\Delta E/\Delta t$ - nach Start minus $\Delta E/\Delta t$ - vor Start.

Die Kurve geht nicht durch den Null-Punkt, da die alleinige Zugabe von Acetokinase den Vorlauf ($\Delta E/\Delta t$ vor Start) um den Betrag $\Delta E_{334}/10 \text{ min} = a$ beschleunigt.

Herstellung der Acetyl-Phosphat-Glucose-6-Phosphotransferase aus *Aerobacter aerogenes* +

M. Y. KAMEL und R. L. ANDERSON fanden das phosphatübertragende Enzym in Extrakten aus *Aerobacter aerogenes* PRL-R 3 (46), aus dem sie es auch weiter anreicherten. Dieser Stamm stand nicht zur Verfügung und ein Anreicherungsverfahren war nicht veröffentlicht. Hohe Aktivitäten fanden sich nach eigenen Untersuchungen auch im Extrakt aus *Aerobacter aerogenes*, Catalogue No. 418, National-Collection of Type Cultures, Colindale, London⁺⁺ und in Extrakten von aus oberbayerischer Rohmilch isoliertem *Aerobacter aerogenes*, Stamm Nr. 43 der Fa. Boehringer, Mannheim. Aus diesen Extrakten⁺⁺⁺ wurde das Enzym angereichert. Die Anreicherung erfolgte in 3 Schritten:

- a) Chromatographische Reinigung durch DEAE-Cellulose-Ionenaustauscher
- b) Gelfiltration mit Sephadex G-200 Gel,
- c) Ammoniumsulfat-Fällung.

a) Chromatographische Reinigung durch DEAE-Cellulose-Ionenaustauscher: Durch diesen Reinigungsschritt wird das Enzym vollständig von Hexokinaseaktivität befreit und auf das 20fache angereichert. DEAE-Cellulose (Kap.: 0,5, Fa. Serva, Heidelberg) wird nach Vorschrift gequollen (bzw. regeneriert) und mit 0,01 M K-Phosphat-Puffer, pH 7,4, equilibriert. Eine größere Fritte (Durchmesser: 12 cm) wird damit ca. 7 cm hoch, fest und gleichmäßig bepackt. Der klarzentrifugierte und mit Wasser 1:10 (auf 0,01 M K-PO₄) verdünnte Rohextrakt (1500 ml) wird rasch durch die DEAE-Cellulose mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe in eine Saugflasche gesogen. Die Fritte wird von Zeit zu Zeit bei kurzer Unterbrechung des Vakuums abgehoben und portionsweise festes Ammonsulfat in das Eluat gegeben und eine schnelle Fällung des in starker Verdünnung vorliegenden Proteins anzustreben. Ein Magnetrührer auf dem die Saugflasche steht sorgt für rasche und gleichmäßige Lösung des Ammonsulfats. Ein Teil der Enzymaktivität

+ Das Herstellungsverfahren wurde in Zusammenarbeit mit cand. med. J. Böttger entwickelt.

++ Die untersuchten Extrakte waren bereits 1 Jahr bei -20°C gelagert. Sie entstammten einer Zucht von Dr. Phillip Felts, 2. Med. Klinik der Universität München, Labor für klinische Biochemie, dem ich für die freundliche Überlassung zu Dank verpflichtet bin.

+++ 10 % Suspension von *Aerobacter aerogenes* in 0,1 M K-Phosphat-Puffer, pH 7,4, durch Ultraschall aufgeschlossen. Diese Suspension war uns freundlicherweise von Herrn Dr. H. Bergmeyer, Fa. Boehringer, überlassen worden.

durchläuft ungebunden den Ionenaustauscher, die restliche Aktivität wird mit 0,01 M K-Phosphat-Puffer, pH = 7,4 (1500 ml) und 0,02 M K-Phosphat-Puffer, pH = 7,4 (1500 ml) eluiert. Es bewährte sich, das Eluat in mehreren bereitstehenden Saugflaschen in Portionen von je 750 ml aufzufangen, während des Eluierens schon mit der Ammoniumsulfatfällung zu beginnen und diese dann in den nacheinander anfallenden Portionen getrennt bis zu 90 % Sättigung fortzuführen. In wenigen Stunden kann auf diese Weise eluiert, gefällt und abzentrifugiert, und damit aus dem verdünnten Rohextrakt (1500 ml) ein 20fach angereichertes und hexokinasefreies Enzympräparat hergestellt werden.

Das abzentrifugierte Protein wird in möglichst wenig 0,02 M K_2 Phosphat-Puffer, pH 7,4, gelöst und gegen den gleichen Puffer einige Stunden dialysiert. Bei $-20^{\circ}C$ ist es mindestens 4 Wochen haltbar. Die Ausbeute des wie beschrieben durchgeführten Schrittes beträgt 50 %. Möglicherweise wird Gluconsäure-6-Phosphat Dehydrogenase abgetrennt, ein Enzym, das durch seine $TPNH_2$ liefernde Reaktion eine zu hohe Aktivität des Rohextraktes vortäuschen kann. Dieses Problem wurde nicht näher untersucht.

b) Gelfiltration mit Sephadex G-200 Gel: Die weitere Reinigung der Phosphotransferase erfolgte durch Gelfiltration mit Sephadex G-200 Gel. Maximal 6 ml des wie oben beschrieben dialysierten Enzyms werden auf eine Säule (Füllhöhe: 80 cm, Durchmesser: 2,5 cm) aufgetragen. Filtriert wird mit 0,02 M K-Phosphat Puffer, pH 7,4. Das Filtrat wird in Fraktionen von ca. 4 ml gesammelt. Die Fraktionen mit der höchsten Enzymaktivität werden vereinigt. Abbildung 6 zeigt das Ergebnis einer so durchgeführten Gelfiltration.

c) Ammoniumsulfat-Fällung: Zur Konzentrierung und zusätzlichen Anreicherung der gelfiltrierten Enzymlösung wird erneut mit Ammoniumsulfat gefällt. Das bis zu 50 % Sättigung ausfallende Protein wird abzentrifugiert und verworfen, das anschließend bis 90 % Sättigung ausfallende Protein enthält praktisch die gesamte Aktivität. Es wird abzentrifugiert, in möglichst wenig 0,02 M K-Phosphat-Puffer aufgenommen und einige Stunden gegen denselben Puffer dialysiert. Es ist dann bei $-20^{\circ}C$ mindestens einige Wochen haltbar.

Durch den Schritt der Gelfiltration gelingt eine weitere Anreicherung der Phosphotransferase um das 3-4fache bei einer Ausbeute von ungefähr einem Drittel. Wie aus Abbildung 6 ersichtlich, ergibt eine Vereinigung und Fällung lediglich der Fraktionen 40-44 ein höher gereinigtes Präparat bei allerdings geringerer Ausbeute.

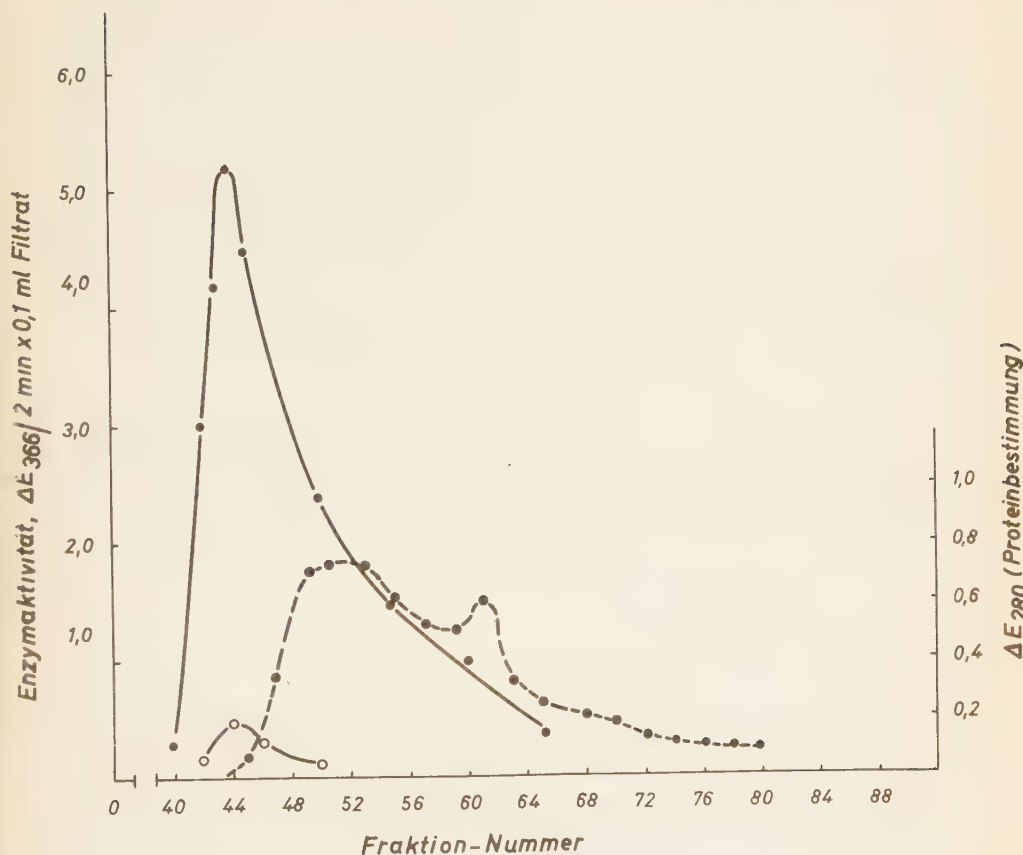


ABBILDUNG 6

Gel-Filtration des angereicherten Extraktes aus *Aerobacter aerogenes* (vgl. Text).

Proteingehalt des Filtrates (●----●). Die Bestimmung erfolgte durch Messung der Extinktion bei 280 $m\mu$ (10 mm Schichtdicke, Spektrometer der Fa. Zeiss). Enzymaktivität mit Acetyl-Phosphat und Glucose als Substrat (●—●) (Bestimmung und Definition vgl. Text S. 36).

Enzymaktivität mit ADP (anstatt Ac-P) und Glucose als Substrat (o—o) (Einsatz 0,05 ml 0,1 M ADP, Reaktionstemperatur 37°C, sonst wie S. 36 angegeben (Vergl. auch Seite 37 und 38)).

Tabelle 3 zeigt das Ergebnis eines wie auf Seite 34 beschriebenen Anreicherungsanges.

TABELLE 3

Anreicherung der Acetyl-P-Glucose-6-Phosphotransferase aus *Aerobacter aerogenes*

Präparat	Gesamt-Volumen (ml)	Aktivität je 0,1 ml (Def. s. u.)	Protein je 0,1 ml (mg)	Aktivität je mg Protein	Gesamt-Aktivität
Rohextrakt 1:10 verdünnt	1500	0,75	0,31	2,4	11000
Eingeengtes Eluat der DEAE-Celulose-Chromatographie	4,9	9,3	2,04	45	4600
Eingeengtes Gel-Filtrat, Fraktion zwischen 50 % - 90 % Ammonsulfatsättigung	2,8	70	0,54	130	2000

Bestimmung der Enzymaktivität der Acetyl-Phosphat-Glucose-6-Phosphotransferase

a) Prinzip:



Die Bildungsgeschwindigkeit von TPNH_2 , direkt meßbar durch die Geschwindigkeit der Extinktionszunahme, ist abhängig von der Reaktionsgeschwindigkeit von Reaktion Gl.10. Liegen die Substrate Acetyl-Phosphat und Glucose in der jeweiligen Sättigungskonzentration vor ⁺⁺⁺, wird die Reaktionsgeschwindigkeit bestimmt durch die Aktivität der AGT.

⁺⁺⁺ Die Michaeliskonstante der AGT ist für Acetyl-Phosphat: $2 \times 10^{-3}\text{M}$, für Glucose: 10^{-4}M (46).

b) Arbeitsweise:

In eine bei 25°C inkubierte 1 cm Schalkuvette wird nacheinander pipettiert:

- 0,05 ml 1 M Tris-HCl-Puffer, pH 7,55,
- 0,05 ml 0,1 M Acetyl-Phosphat (hergestellt nach (2)),
- 0,01 ml 0,5 M Glucose,
- 0,01 ml 0,5 M $MgCl_2$,
- 0,01 ml 0,05 M TPN,
- 0,02 ml Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (Handelspräparat, 5 mg/ml 1:25 verdünnt),
- Aqua dest. ad 0,6 ml Gesamtvolumen.

Nach 5 min. Vorinkubation wird mit AGT gestartet. Die Extinktionszunahme wird mit einem Direkt-Schreiber aufgezeichnet.

c) Definition der Aktivität:

Die Aktivität wird aus praktischen Gründen definiert als $\Delta E_{366} / 2 \text{ min} \times \text{mg Protein}$ bei wie oben beschriebenem Testansatz und einer Reaktionstemperatur von 25°C. Die Proteinbestimmung in den Enzympräparaten erfolgte mit dem Biuret Reagenz (5) bzw. mit dem von LOWRY angegebenen Test (57).

Nachtrag einiger experimenteller Ergebnisse zur Kinetik des katalytischen Acetatbestimmungstests

Die stufenweise Erhöhung der Reaktionstemperatur von 25°C bis 40°C ergibt eine lineare Zunahme der Empfindlichkeit (zeitliche Extinktionsänderung bezogen auf die Acetatkonzentration) und zwar ungefähr eine Verdoppelung bei einer Temperaturerhöhung von 14°C.

Die Erniedrigung der Wasserstoffionenkonzentration von pH = 6,9 auf pH = 7,6 bewirkt eine zunehmende Empfindlichkeitssteigerung um 80 %.

Die graphische Darstellung der Empfindlichkeit in Abhängigkeit der Konzentration von ATP, TPN, Glucose, Glucose-6-P-Dehydrogenase, Acetyl-P-Glucose-6-Phosphotransferase, ergibt eine regelrechte Sättigungskurve.

Ein höherer als oben angegebener Einsatz von Acetokinase führt zu einer Hemmung und damit Empfindlichkeitsverminderung des Testes. Wie auf dem Originalbild der Eichkurve in Abbildung 4, Seite 30, zu sehen ist, nimmt auch vor dem Start mit Acetokinase die Extinktion mit gleichbleibender Geschwindigkeit zu. Dieser Vorlauf der Reaktion wird durch die Zugabe von Acetokinase etwas beschleunigt (vergl. die Kurve

die dem Einsatz von $9\mu\text{Mol}$ Acetat entspricht). Er ist in einem großen Konzentrationsbereich linear abhängig von der Konzentration an Phosphotransferase, Glucose und TPN, jedoch weitgehend unabhängig von ATP. Während der eigentliche Acetatlauf der Reaktion ($\Delta E/\Delta t$ nach Start minus $\Delta E/\Delta t$ vor Start) bei einer TPN-Konzentration von $0,5\text{ mM}$ gesättigt ist, zeigt der Vorlauf ($\Delta E/\Delta t$ vor Start) eine lineare TPN-abhängige Zunahme bis über eine Konzentration von $6\mu\text{M}$. In einem Testansatz mit Tris-Puffer, MgCl_2 , Glucose, TPN, Glucose-6-P-Dehydrogenase und AGT konnte die gleichzeitige Bildung ähnlicher Mengen TPNH_2 und DPN gemessen werden (DPN wurde nach der von KLINGENBERG angegebenen Methode bestimmt (6)). Es lag deshalb die Vermutung nahe, daß die Acetyl-P-Glucose-6-Phosphotransferase auch von TPN Phosphat auf Glucose übertragen kann unter Bildung von Glucose-6-P und DPN. Bei weiteren Untersuchungen der Spezifität dieses Enzyms fiel auf, daß eine gealterte Lösung von ATP im Gegensatz zu einer frisch bereiteten den Vorlauf deutlich steigert. Nun ist bekannt, daß ATP in wässriger Lösung langsam spontan in ADP und Phosphat zerfällt (9). Wie weitere Untersuchungen zeigten, besitzt die AGT zu ADP als Phosphatdonator eine weit größere Affinität als zu ATP (Abbildung 7). Da sich das Verhältnis der Aktivitäten der AGT mit Acetyl-P und Glucose, bzw. ADP und Glucose als Substrat während sämtlicher Reinigungsschritte des Extraktes aus *Aerobacter aerogenes* als stets das gleiche erwies (vergl. auch Abbildung 6, Seite 35), ist es sehr wahrscheinlich, daß beide phosphatübertragenden Reaktionen von dem gleichen, nicht auf Acetyl-P spezifischen Enzym katalysiert werden. Diese Unspezifität erklärt auch den beobachteten steilen und langanhaltenden Vorlauf beim Einsatz von enteiweißtem Leberextrakt in das auf Seite 30 angegebene Testsystem. Wahrscheinlich reagiert das unspezifische phosphatübertragende Enzym außer mit ADP und TPN noch mit einer Vielzahl anderer im Leberextrakt vorkommender Phosphatverbindungen. Die Vermutung, der wegen der anderen Problemstellung dieser Arbeit nicht weiter nachgegangen worden war, wurde von H. BERGMAYER und H. MÖLLERING (7a) bestätigt. Diese Autoren fanden eine Vielzahl von Acylphosphat-Verbindungen ($\text{R-C}^{\text{O}}\text{-O-PO}_3\text{H}_2$, z. B. Benzoylphosphat, Propionylphosphat, Carbamylphosphat und Succinylphosphat) deren Phosphat durch die AGT (von ihnen richtiger Acylphosphat-D-Glucose-6-Phosphotransferase genannt) auf Glucose übertragen wird. Im Gegensatz zu den hier beschriebenen Ergebnissen konnten sie jedoch keine Phosphatübertragung von ADP auf Glucose beobachten. Der Grund dafür mag die fast $1/10$ geringere Glucosekonzentration bei ihren Aktivitätsbestimmungen ($0,88\text{ mM}$ Glucose) im Vergleich zu der hier beschriebenen ($8,3\text{ mM}$ Glucose) sein.

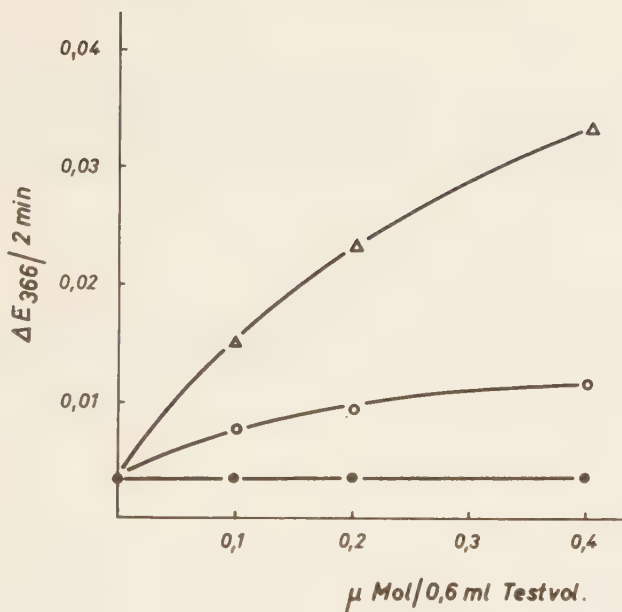


ABBILDUNG 7

Affinität der AGT zu ATP, ADP, AMP als Phosphat-Donatoren:

Steigende Mengen von ATP (o—o), ADP (Δ—Δ) und AMP (●—●) werden mit 0,05 ml 0,1 M Tris-Puffer, pH = 7,55, 0,01 ml 0,5 M $MgCl_2$, 0,01 ml 0,5 M Glucose, 0,01 ml 0,05 M TPN, 0,02 ml G-6-PDH (1:25 verdünntes Präparat der Fa. Boehringer, 5 mg/ml), 0,01 ml AGT (Aktivität: 2,8 E pro 0,01 ml) und Aqua dest. ad 0,6 ml bei 37°C inkubiert. Die Extinktionszunahme bei 366 $m\mu$ wird mit dem Direktschreiber aufgezeichnet.

3. BESTIMMUNG DER BEI ENZYMATISCHER HYDROLYSE DES ACETYL-CoA FREIGESETZTEN SULFHYDRYL-GRUPPEN MIT DEM DICHLORPHENOLINDOLPHENOL-TEST

Prinzip

Die im Acetyl-CoA thioesterartig gebundenen Sulfhydryl-Gruppe des CoA wird bei dessen hydrolytischer Spaltung frei. Durch sie wird Dichlorphenolindolphenol reduktiv entfärbt. Das Auftreten von -SH kann direkt optisch durch Abnahme der Extinktion bei 578 m μ verfolgt werden.

Notwendige Reagentien

1. Dichlorphenolindolphenol,
2. Tris-hydroxymethyl-aminomethan, Tris, reinst.
3. Acetyl-CoA (vergl. Seite 25)
4. N₂-Gas

Arbeitsweise

Das auf Deacylase-Aktivität zu testende Gewebe wird extrahiert, der Gewebsextrakt dialysiert und anschließend in den DPI-Test eingesetzt. (Untersuchungsmaterial, Extraktion und Dialyse s. S. 28.) Die Dialyse ist notwendig, da andernfalls in tierischen Geweben reichlich vorhandene reduzierende Substanzen mit DPI unter Entfärbung reagieren würden.

DPI-Reaktion

In zwei automatisch wechselbare 1 cm Schmalkuvetten die auf der konstanten Temperatur von 25°C gehalten werden, wird jeweils nacheinander pipettiert:

- 0,04 ml 0,04 % wässrige DPI-Lösung,
- 0,16 ml 0,5 M Tris-HCl-Puffer, pH 7,4,

In Kuvette (1) dazu

- 0,2 ml Aqua dest.

in Kuvette (2)

- 0,2 ml 7,5 mM Acetyl-CoA

Die auftretende Extinktionsänderung ΔE_{578} in beiden Reaktionslösungen wird durch einen Direktschreiber automatisch abwechselnd aufgezeichnet (vergl. Abbildung 8). In Kuvette (2) reagiert zunächst das als Verunreinigung im Acetyl-CoA vorhandene freie Coenzym A mit DPI. Das mit dem Ende dieser Reaktion erreichte Plateau bleibt nicht bestehen. Durch den Luftsauerstoff wird das reduzierte und entfärbte DPI

langsam wieder oxydiert. Die Extinktion nimmt wieder langsam zu. Diese spontane Oxydation des DPI kann durch sorgfältige N_2 -Begasung verhindert werden. In dem gezeigten Beispiel wird ihr Betrag als konstant angenommen und bei der Auswertung mitberücksichtigt.

Nach 5 min gleichbleibendem Lauf wird in beide Kuvetten jeweils pipettiert (Abbildung 8, Pfeil a):

0,005 ml dialysierter Gewebsextrakt (0,73 mg Protein/ml)

Die im Protein vorhandene SH-Gruppen reagieren rasch ab. Während der dadurch verursachte steile Anfangslauf in Kuvette (1) nach kurzer Zeit zu Ende kommt, bleibt im System (2) eine konstante Extinktionsabnahme bestehen. Das durch die Deacylase freigesetzte CoA reagiert mit dem DPI. Durch weitere Zugabe von Rohextrakt

0,015 ml (0,73 mg Protein/ml) (Pfeil b)

0,005 ml (7,3 mg Protein/ml) (Pfeil c)

0,005 ml (7,3 mg Protein/ml) (Pfeil d)

wird das Acetyl-CoA mit immer größerer Geschwindigkeit enzymatisch gespalten. Die Extinktionsabnahme steigt linear mit der Menge des eingesetzten Proteins an. (Bei Pfeil d in Abbildung 8 wurde der Registrierbereich für System (2) um $\Delta E = 0,250$ verkleinert.)

Berechnung

Wird die Autoxydation des entfärbten DPI durch sorgfältige N_2 -Begasung verhindert, verläuft die Reduktionsreaktion quantitativ. Ein Mol -SH entfärbt ein Mol DPI. Standardwerte und Eichkurve sind nicht erforderlich. In Tabelle 4 sind die Ergebnisse der Aktivitätsbestimmung, deren Originalwiedergabe Abbildung 8 zeigt, zahlenmäßig dargestellt. Bei dem molaren Extinktionskoeffizient des DPI. $E_{578} = 26,5 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol}$, ergibt sich die Enzymaktivität: $A_{25^\circ C} = 0,33 \mu\text{Mol}/\text{mg Protein} \times \text{Stunde}$.

TABELLE 4

Aktivitätsbestimmung der Acetyl-CoA-Deacylase
in Rohextrakt aus Ascites Tumor
(Die Werte sind umgerechnet auf 0,4 ml Testvolumen)

mg Protein pro 0,4 ml	0,000	0,003	0,014	0,048	0,081	0,1 ⁺
ΔE_{578} pro 10 Min. x 0,4 ml	-0,014	+0,008	0,055	0,165	0,250	0,365 ⁺

⁺ Graphisch ermitteltes Wertepaar

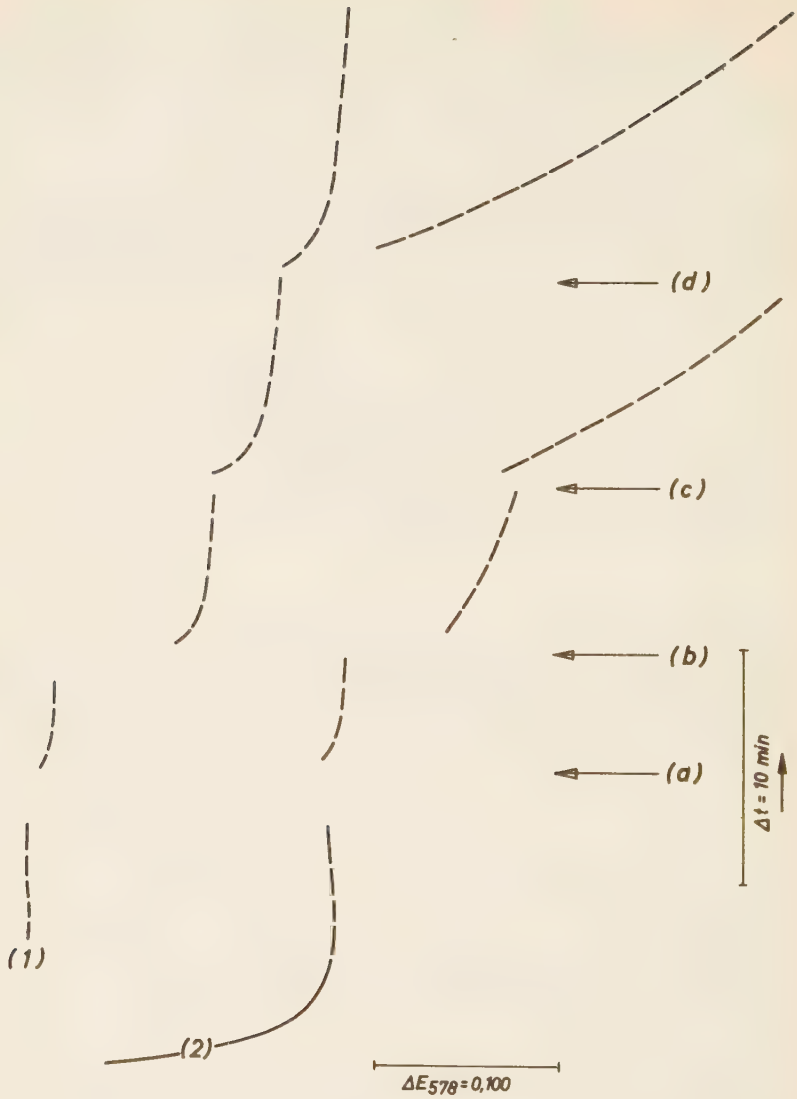


ABBILDUNG 8

Originalwiedergabe einer Aktivitätsbestimmung der Acetyl-CoA-Deacylase mit dem DPI-Test in Extrakt aus Ascites-Tumorzellen, vgl. laufenden Text.

C. E R G E B N I S S E

I. VERTEILUNG DER ESSIGSÄURE IM TIERKÖRPER

Der Acetatgehalt verschiedener Rattenorgane ist in Tabelle 5 zusammengestellt. Wie man sieht kommt freie Essigsäure in allen untersuchten Geweben in deutlich nachweisbaren Mengen vor. In der Leber ist der Acetatgehalt größenordnungsmäßig einigen Glycolyse-Zwischenprodukten, wie α -Glycerophosphat, Pyruvat, Phosphoenolpyruvat und anderen (41) vergleichbar. Es erscheint bemerkenswert, daß die freie Essigsäure den Gehalt der Leber an Acetyl-CoA (Normalwerte 0,02 μ Mol/g Leber) um das 8-10fache übersteigt (110).

TABELLE 5

Acetatverteilung bei der Ratte

Tier Nr.	Leber	Herz	Niere (μ Mol/g Frischgewicht)	Ge- hirn (μ Mol/g Frischgewicht)	Milz	Skel. M.	Hoden	Blut- plasma (μ Mol pro ml)
1	0,165	0,064	0,064	0,110	0,114	0,050	0,065	0,172
2	0,126	0,102	0,137	0,120	0,062	0,092	0,058	0,158
3	0,214	0,175	0,126	-	-	0,054	0,040	0,175

II. ESSIGSÄURE IM BLUT

1. ACETATGEHALT DES BLUTPLASMAS EINIGER SÄUGETIERE

Auch im Blut wird Acetat regelmäßig in ähnlichen Konzentrationen gefunden (Tab. 6). Die hier angegebenen Werte von Humanblut liegen in dem von LUNDQUIST (59) beschriebenen Bereich von 0,05 - 0,1 μ Mol/ml. Sie entsprechen etwa der Höhe der Brenztraubensäure (31) oder des Glycerinspiegels (108). Wie aus Tabelle 6 hervorgeht, ist der Plasmaacetatspiegel bei Rindern (Wiederkäuern) stark von Ernährungsbedingungen abhängig (s. Seite 45).

TABELLE 6

Acetatgehalt des Blutplasmas einiger Säugetiere

Versuch Nr.	Mensch	Rind ⁺ (μ Mol/ml Plasma)	Schwein	Ratte	Maus
1	0,034	0,084	0,177	0,166	184
2	0,137	0,081	0,196	0,158	210 ⁺⁺⁺
3	0,050	0,206	0,194	0,256	-
4	0,042	0,640	-	0,192	-
5	0,107	0,790	-	0,195 ⁺⁺	-

+ Versuch 1-3: Schlachtvieh, mindestens 24 Stunden vor Schlachtung gehungert. Versuch 4 u. 5: Mit Rüben und Heu frisch gefütterte Stalltiere.

++ Mittelwert aus 26 Einzelwerten (vergl. Tabelle 9).

+++ Mischblut von 5 Tieren.

2. ACETATGEHALT VON HUMAN- UND RATTENBLUT AUS VERSCHIEDENEN ABSCHNITTEN DER BLUTBAHN

Auf der Suche nach der Herkunft der freien Essigsäure im Blut wurde venöses Blut einiger Organe und arterielles Blut untersucht. Nachdem GERGELY (32) die größte Aktivität an Acetyl-CoA-Deacylase, im Herzmuskel gefunden hatte -die Ergebnisse konnten wir in späteren Untersuchungen nicht bestätigen- erschien die Untersuchung des Plasmaacetats im venösen Herzmuskelblut von besonderem Interesse. Die in Tabelle 7 angegebenen Werte entstammen heparinisiertem durch Herzkatheter entnommenem Humanblut. ⁺⁺⁺⁺ Ein verwertbarer Unterschied im Acetatgehalt ist dabei nicht festzustellen. Auch die Acetatspiegel von venösem und arteriellem Rattenblut weisen keinen sicheren Unterschied auf, wie die Werte von Tabelle 9 zeigen. Die Blutproben zu den dort aufgeführten Acetatbestimmungen waren durch Punktion der rechten bzw. linken Herzkammer entnommen worden. Ein Unterschied im Acetatgehalt fiel nicht auf.

⁺⁺⁺⁺ Herrn Chefarzt Dr. Blömer, I. Med. Abteilung des Städt. Krankenhauses rechts der Isar, München, möchte ich für die freundliche Überlassung der Blutproben hiermit ergebenst danken.

TABELLE 7

Acetatgehalt von Humanblut aus verschiedenen Abschnitten der Blutbahn

Patient Nr.	Bulbus jugulavis	Sinus coronarius (μ /Mol / ml Plasma)	Arteria femoralis
A	51	59	84
B	97	-	94

Der Acetatgehalt von Humanblut aus der Vena cut. antebrachii verschiedener Patienten lag im Bereich zwischen 150 und 55 μ Mol/ml (Vergl. Abb. 9, S. 50).

3. ABHÄNGIGKEIT DES PLASMAACETATSPIEGELS VON DER FUTTER-AUFNAHME BEI WIEDERKÄUERN

Der Plasmaacetatspiegel beim Rind, ist wie die Werte in Tabelle 6 zeigen, stark von der Futteraufnahme abhängig. Bekanntlich wird bei Wiederkäuern Frischfutter im Gärmagen unter anderem auch zu Essigsäure vergoren. Dies führt zu einem erheblichen Anstieg des Plasmaacetatspiegels kurz nach Fütterung. Die Essigsäure ist bei diesen Tieren ein wichtiger Energielieferant. Sie gelangt vom Magen über das Pfortadersystem in die Leber, die freie Essigsäure sehr rasch zu Acetyl-CoA aktivieren und verbrennen kann. Ein Teil des der Leber zufließenden Acetates passiert diese unverändert und gelangt in den großen Blutkreislauf.

4. PLASMAACETATSPIEGEL NACH ORALER ACETATBELASTUNG BEI RATTEN

Im Gegensatz zu Wiederkäuern ist bei Ratten der Plasmaacetatspiegel im allgemeinen nicht durch die Art der Ernährung beeinflussbar. Selbst bei Tieren, denen peroral durch eine Schlundsonde 3-6 mMol Acetat (Acetattuffer) gegeben worden war, konnte eine Erhöhung des Plasmaspiegels nicht nachgewiesen werden.

5. PLASMAACETATSPIEGEL BEI ALIMENTÄRER LIPÄMIE BEI RATTEN

Ebenfalls unbeeinflussbar blieb der Acetatspiegel bei Ratten mit ernährungsbedingter Erhöhung der Lipide und freien Fettsäuren im Blut. Bei Tieren, die nach zweitägigem Hungern ausschließlich mit Räucherspeck ernährt worden waren, stieg der Acetatspiegel im Blut auf Werte zwischen 5-20 mg % an. Wie die Ergebnisse in Tabelle 9 zeigen, blieb dabei der Acetatspiegel im Bereich des Normalen.

6. ABHÄNGIGKEIT DES PLASMAACETATSPIEGELS VON DER SCHILDDRÜSENFUNCTION BEI RATTEN

Eine Unterfunktion der Schilddrüse führt bekanntlich ebenfalls zu einer Vermehrung der Lipoide und freien Fettsäuren im Blut. Acetatbestimmungen bei Ratten, die längere Zeit mit Thyreostatika behandelt worden waren, erbrachten ebenfalls normale Werte.

Die Tiere, deren Plasmaacetatwerte in Tabelle 8 gezeigt werden, waren 5 Wochen lang mit Irenat (8,5 ml in 1 l Trinkwasser, 1 ml Irenat enthält 300 mg Perchlorat, Tropon-Werke, Köln-Mülheim) und während der ersten 10 Tage mit Favistan (2 mg 2 x täglich subcutan, Asta-Werke, Brackwede, Westf.) behandelt worden. Während gleichaltrige Normalratten in dieser Zeit ungefähr 100 g an Körpergewicht zunahmen (von 200 g auf 300 g) war bei den behandelten Tieren nur eine Gewichtszunahme von ca. 40 g festzustellen.

TABELLE 8

Plasmaacetatspiegel bei hypothyreoten Ratten

Ratte Nr.	Plasmaacetat nach Behandlung (μ Mol/ml)	proteingebundenes Jod ⁺	
		vor Behandlung (μ %)	nach Behandlung (μ %)
1	0,244	1,4	1,3
2	0,128	1,8	2,0
3	0,190	3,6	1,2
4	0,210	1,9	0,6
5	0,210	1,4	0,1
6	0,170	3,2	1,7
7	0,108	0,8	0,0
8	0,175	1,2	-
9	0,188	-	-
10	0,140	-	-
M	0,176	1,9	1,0
S [†]	0,013	0,1	0,3

⁺ Das proteingebundene Jod (PBI) wurde freundlicherweise von cand. med. J. Thomann nach der Methode von H. SPITZY et al. bestimmt (90

TABELLE 9

Plasmaacetatspiegel bei normalen, chron. alloxan-diabetischen Ratten und Ratten mit alimentärer Erhöhung der Ketonkörper

Normalratten Acetat (μ Mol/ml)	chron. diabetische Ratten ⁺ Acetat (μ Mol/ml)	Blutzucker ⁺⁺ (mg%)	Ratten m. aliment. Ketose Acetat (μ Mol/ml)	Acetacetat ⁺⁺⁺ (mg%)
0,210	0,275	460	0,132	7,5
0,236				
0,247	0,207	582	0,126	14,5
0,256				
0,210	0,259	700	0,290	8,1
0,172				
0,130	0,274	460	0,149	16,5
0,124				
0,097	0,254	409	0,242	6,25
0,146				
0,152	0,333	455	0,222	5,26
0,138				
0,217	0,267	477	0,264	5,43
0,166				
0,166	0,275	364	0,235	5,43
0,178				
0,262	0,420	519	0,310	6,15
0,273				
0,140	0,270	418	-	-
0,354				
0,218	0,300	467	-	-
0,160				
0,244	0,490	418	-	-
0,168				
0,162	0,310	552	-	-
0,192				
M 0,195	0,288		0,217	
S $\pm$ 0,010	0,029		0,022	
n 26	14		9	
M%	+ 48		-	
P	0,0005		-	

+ Zur Erzeugung eines möglichst langausgedehnten Diabetes wurden ca. 200 g schwere Ratten nach s.c. Injektion von 160 mg/kg Alloxan mit unterschwelligen Insulindosen (2-3 mal wöchentlich je 3 E Depot Insulin, Hoechst) gerade lebensfähig erhalten. Vergl. HOCHHEUSER et al. (39).

++ Bestimmt nach der Methode "Wahre Glucose" (Klin. chem. Untersuchung mit dem Photometer Eppendorf, Fa. Netheler u. Hinz GmbH, Hamburg)

+++ Bestimmt nach WALKER (103)

7. PLASMAACETATSPIEGEL, CHRONISCH DIABETISCHER RATTEN

Chronisch alloxandiabetische Ratten, die mit kleinen Insulindosen 2-3 Monate am Leben erhalten wurden, zeigten eine signifikante Erhöhung des Plasmaacetatspiegels. Die Werte sind in Tabelle 9 zusammengestellt. Auf die mögliche Bedeutung dieses Befundes im Hinblick auf die Entwicklung degenerativer Gefäßerkrankungen (39, 113) wird in der Diskussion näher eingegangen.

8. PLASMAACETATSPIEGEL BEI ALKOHOLBELASTUNG

In Übereinstimmung mit Versuchen von LUNDQUIST war ein deutlicher Anstieg des Plasmaacetatspiegels beim Menschen nach akuter Alkoholbelastung zu finden. Abbildung 10 zeigt das Verhalten der Essigsäure im Blut nach peroraler Aufnahme einer Testdosis Alkohol. Wie man sieht, steigt der Acetatspiegel im Laufe von 60 Minuten auf etwa das Fünffache an und hält sich während der folgenden 3 Stunden etwa in gleicher Höhe.

Im Gegensatz zur akuten Belastung beim Menschen ändert sich bei chronischer Alkoholgabe bei Ratten, die 8 Wochen lang 7,5 % Äthanol im Trinkwasser hatten, die Essigsäure im Blut nicht (Tabelle 10).

TABELLE 10

Acetatspiegel im Plasma bei chron. mit Alkohol belasteten Ratten. Im Blut dieser Tiere war kein Alkohol nachzuweisen.

Ratte Nr.	vor Alkoholangebot	nach 8-tägigem Alkoholangebot	nach 8-wöchigem Alkoholangebot
(Plasmaacetat in $\mu\text{Mol/ml}$)			
1	0,217	0,117	0,242
2	0,167	0,133	0,260
3	0,262	0,207	0,200
4	0,140	0,196	0,160
5	0,218	0,183	0,233
6	0,243	0,245	0,188
7	0,162	-	-
8	0,192	0,304	-
9	0,245	0,144	0,197
10	0,256	0,233	0,204
Mittelwert	M: 0,210	0,195	0,200
Standard- abweichung	S: $\pm 0,014$	$\pm 0,022$	$\pm 0,010$

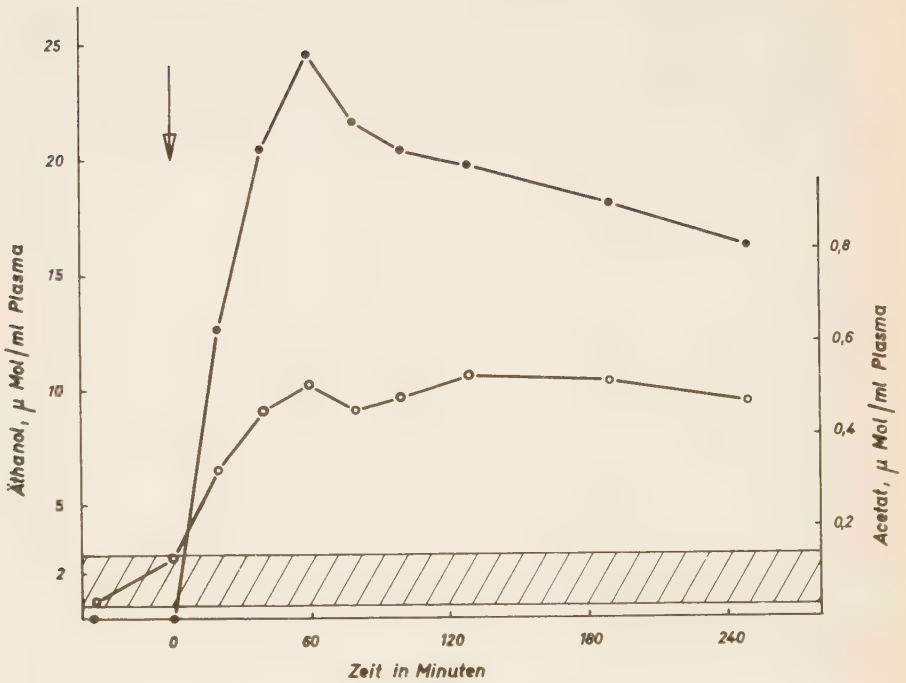


ABBILDUNG 9

Verhalten des Plasmaacetats nach Alkoholbelastung:
 Beim Pfeil wurden 84 ml Äthanol in Form von 200 ml 43 % Wodka innerhalb 4 Minuten getrunken (Selbstversuch). (● — ●) Alkoholspiegel, enzymatisch mit ADH bestimmt (9), (o — o) Acetat. Schraffierter Bereich: Plasmaacetat von 6 Kontrollpersonen. Das Blut wurde durch Armvenenpunktion entnommen.

III. ZUR FRAGE DER BINDUNG DES BLUTACETATS AN SERUMPROTEINE

Zur Klärung der Frage, ob Acetat in frei diffusibler Form oder an Eiweißkörper gebunden im Blut vorliegt, wurde ^{14}C -Acetat zu frisch entnommenem Humanblut gegeben und die Serumproteine papierelektrophoretisch getrennt. Vier Papierstreifen auf die annähernd die gleiche Menge Serum aufgetragen worden war, wurden verschieden lange Zeit dem elektrischen Feld ausgesetzt. Danach wurde die Lage des markierten Acetats durch Radioaktivitätsmessung und die Lage der Serumproteine durch Anfärben bestimmt. Wie die schematische Darstellung dieses Versuches in Abbildung 10 zeigt, wandert Acetat in scharf begrenzter Bande unabhängig von den Eiweißkörpern zur Anode. Es kann daraus geschlossen werden, daß die Essigsäure -im Gegensatz zu den langkettigen unveresterten Fettsäuren- in vitro nicht an Serumalbumin gebunden ist. Sie dürfte somit auch im Blut in freier Form vorliegen.

IV. ACETATSTOFFWECHSEL DER LEBER

Wie die Untersuchungen der Essigsäure im Blut zeigen, bleibt der Plasmaacetatspiegel von wenigen Ausnahmen abgesehen ziemlich konstant. Die Streuungen der einzelnen Werte sind teilweise durch die umständliche und ungenaue Bestimmungsmethode verursacht und entsprechen sicherlich nicht dem physiologischen Verhalten des Acetatspiegels. Selbst nach oraler Gabe einer größeren Menge Acetats bleibt der Acetatspiegel im großen Blutkreislauf unverändert. Da anzunehmen ist, daß Acetat rasch vom Darmlumen in den Pfortaderkreislauf gelangt, der Leber somit nach oraler Acetatbelastung in kurzer Zeit viel Acetat zufließt, ist zu erwarten, daß die Leber sehr leicht Acetat aufnehmen kann. Um diese Fähigkeit der Leber, durch die der ziemlich konstante Acetatspiegel im Blut gewährleistet sein könnte, genauer zu untersuchen, wurde inkubierten Leberdünnschnitten und künstlich durchströmten, isolierten Rattenlebern Acetat als Substrat angeboten und die Abfallgeschwindigkeit des Acetatspiegels in der Inkubations- bzw. Durchströmungslösung bestimmt.

Die Ergebnisse solcher Untersuchungen sind in den Abbildungen 11 und 12 dargestellt. Wie man sieht, nehmen Leberdünnschnitte zwar sehr

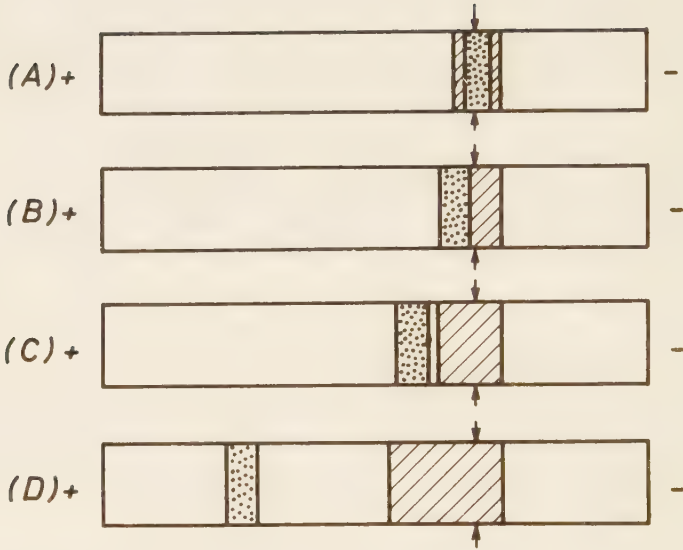


ABBILDUNG 10

Wanderung des zum Blutserum zugesetzten ^{14}C -Acetats im elektrischen Feld:

An gleicher Stelle ($\downarrow$) wurde auf vier Papierstreifen Serum mit ^{14}C -Acetat -dies war zu dem frisch entnommenen noch körperwarmem Blut zugesetzt worden- aufgetragen und 0 min. Streifen (A), 5 min. (B), 20 min. (C) und 60 min. (D) dem elektrischen Feld (225 Volt) unterworfen. Die technische Anordnung der Elektrophorese erfolgte wie an anderer Stelle beschrieben ist (33). Die Proteinbande (▨) wurde durch Anfärben, die Bande des markierten ^{14}C -Acetat (▤) durch Radioaktivitätsmessung festgestellt.

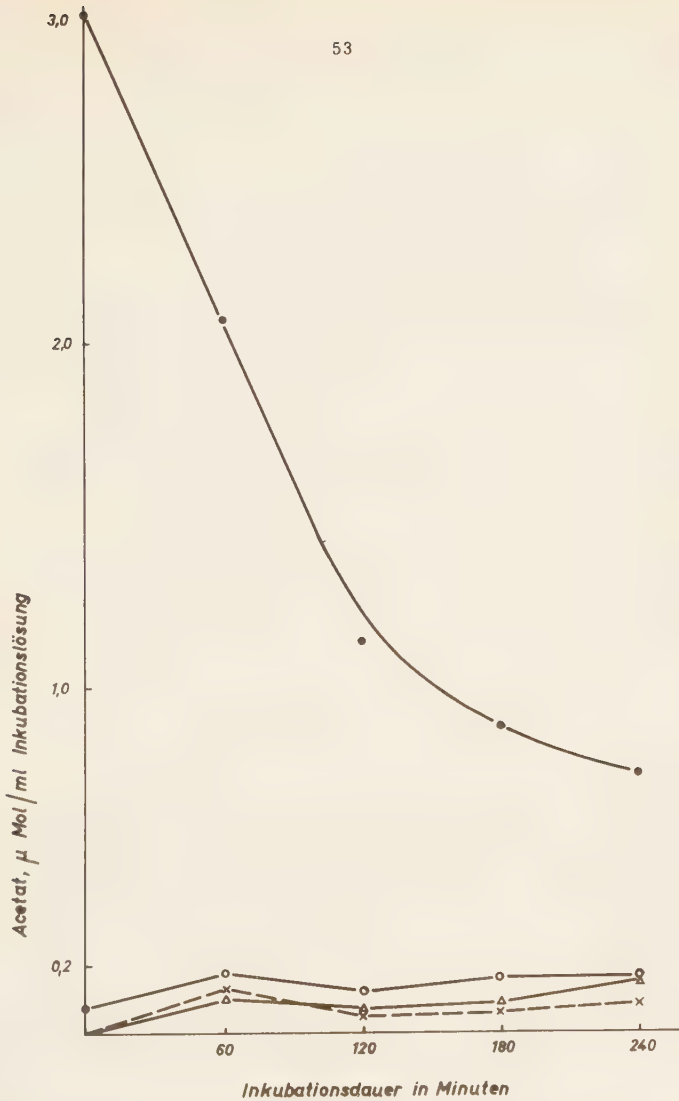


ABBILDUNG 11

Acetat-Stoffwechsel in Leberdünnschnitten.

130-150 mg Rattenleberdünnschnitte werden in 1,5 ml Krebs-Bicarbonat-Ringer-Lösung (50) unter Carbogen-Atmosphäre bei 37°C inkubiert. Zum angegebenen Zeitpunkt wird durch Zugabe von 1,0 ml 6 % Perchlorsäure gestoppt und extrahiert. Jeder Wert entstammt einem eigenen Inkubationssystem. Die Acetatbestimmung erfolgte wie oben angegeben. Als Substrat wurde den Leberschnitten angeboten: (●—●) Acetat (2,66 $\mu\text{Mol/ml}$), (o—o) Pyruvat (2,9 $\mu\text{Mol/ml}$), (x---x) Glucose (5 $\mu\text{Mol/ml}$), (Δ—Δ) keines.

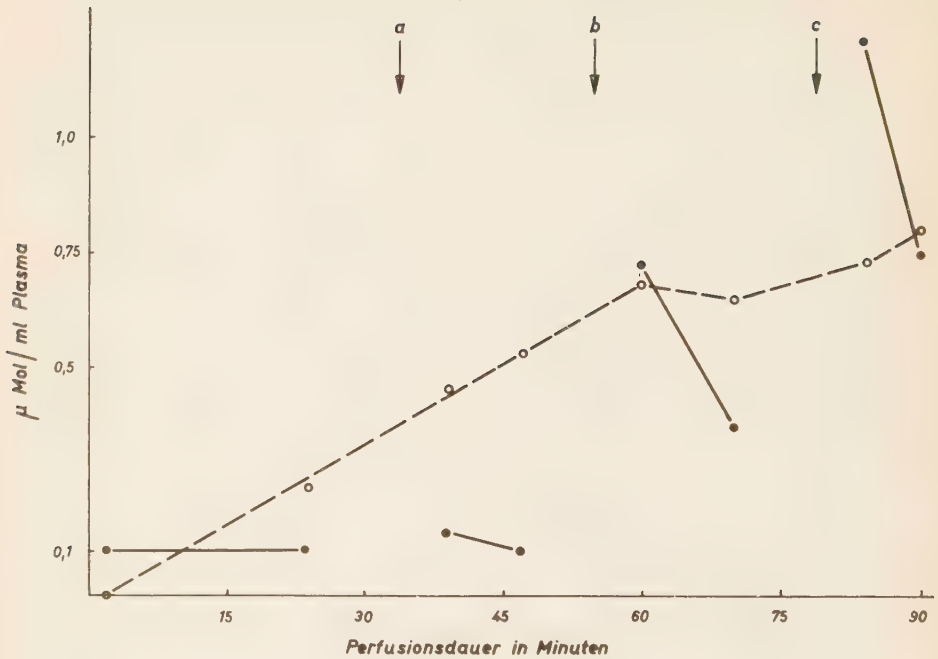


ABBILDUNG 12

Acetataufnahme durch die isolierte Rattenleber:
 Zur Technik der Leberperfusion⁺⁺⁺ siehe (13, 75). Volumen der rezirkulierenden Durchströmungsflüssigkeit 95 ml. Zusätze von Natriumacetat, Pfeil a: 0,126 $\mu\text{Mol/ml}$, Pfeil b: 0,787 $\mu\text{Mol/ml}$, Pfeil c: 1,45 $\mu\text{Mol/ml}$.
 ●—● Acetat, o---o Acetacetat, nach WALKER bestimmt (103). (Die Acetessigsäurebildung wurde in diesem Versuch durch Acetat nicht angeregt, das auftretende Acetacetat dürfte vielmehr den in der Leber vorrätigen Lipoiden entstammen.)

Das Perfusionsblut (72) setzt sich zusammen aus mit Tyrode-Lösung gewaschenen Rinder-Erythrocyten (40 Vol. %), Tyrode-Lösung (60 Vol. %), Rinderalbumin (2 g%, Behring-Werk), Glucose (150 mg%) und Aureomycin (5 mg%, Chemie Grünenthal-GmbH, Stalberg, Rheinland).

⁺⁺⁺

Die Durchströmungsversuche wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Eberhard Struck und Fräulein Sybille Geyer durchgeführt, für deren freundliches Entgegenkommen ich mich an dieser Stelle vielmals bedanken möchte.

leicht größere Mengen Acetat aus dem Inkubationsmedium auf (Abbildung 11), sie können jedoch den sie umgebenden Acetatspiegel nicht so niedrig halten, wie die den physiologischen Bedingungen eher entsprechende perfundierte Leber (Abbildung 12).

Abbildung 13 zeigt das Verhalten des Acetates im Inkubationsmedium von Leberdünnschnitten, denen kein exogenes Substrat angeboten wurde. In den ersten zwei Stunden der Inkubation stellt sich eine Acetatkonzentration ein, die ungefähr dem in vivo Gehalt der Rattenleber entspricht ($0,2 \mu\text{Mol/g}$). Während der weiteren Inkubation wird Acetat mit ständig zunehmender Geschwindigkeit gebildet. Dies ist wahrscheinlich die Folge einer fortschreitenden Zellschädigung durch die unphysiologischen Lebensbedingungen. Auf dieses Problem wird in der Diskussion dieser Arbeit noch näher eingegangen.

Den physiologischen Verhältnissen besser entsprechen die Untersuchungen über den Acetat-Stoffwechsel der künstlich durchströmten, isolierten Rattenleber. Abbildung 12 zeigt den Verlauf eines Durchströmungsversuches bei dem die Leber mit wiederholten Acetatstößen belastet wurde. Die isolierte Rattenleber nimmt Acetat mit Leichtigkeit aus dem Perfusionsmedium auf. Man erkennt, daß die Ausschöpfung um so rascher erfolgt, je mehr Acetat im Medium vorliegt. Die Ausschöpfungsgeschwindigkeit erweist sich dabei als proportional der Konzentration des angebotenen Acetats.

Überraschend an diesem Versuch (Abbildung 12) war der konstante Acetatspiegel von $0,1 \mu\text{Mol/ml}$ Perfusionsblut während der Vorperiode von 20 Minuten, also bevor exogen Acetat zugegeben worden war. Er war bereits in den ersten Minuten des Durchströmungsversuches erreicht. Die Essigsäure konnte nicht durch die Herstellungsweise des Perfusionsblutes in das System eingeschleppt worden sein. Die Vorstellung aber, daß die Leber innerhalb einer Minute in den 95 ml Perfusionsblut den danach konstant bleibenden Acetatspiegel eingestellt haben sollte, erschien recht unwahrscheinlich.

Noch auffallender war das Ergebnis des in Abbildung 16 dargestellten Durchströmungsversuches. Schon bevor die Leber in den künstlichen Blutkreislauf eingeschaltet war, fand sich im zirkulierenden, mit Carbogen begasten und auf 37°C erwärmten Blut ein Acetatspiegel von ungefähr $0,130 \mu\text{Mol/ml}$. Dieser stieg innerhalb von 40 Minuten (bis unmittelbar vor der Einschaltung der Leber) weiter bis auf $0,185 \mu\text{Mol/ml}$ an. Dieses Acetat konnte nicht aus der Leber stammen. Die Vermutung lag nahe, daß die Erythrocyten als einzige zellige Bestandteile des Perfusionsblutes, für die Bildung der freien Essigsäure verantwortlich zu machen sind.

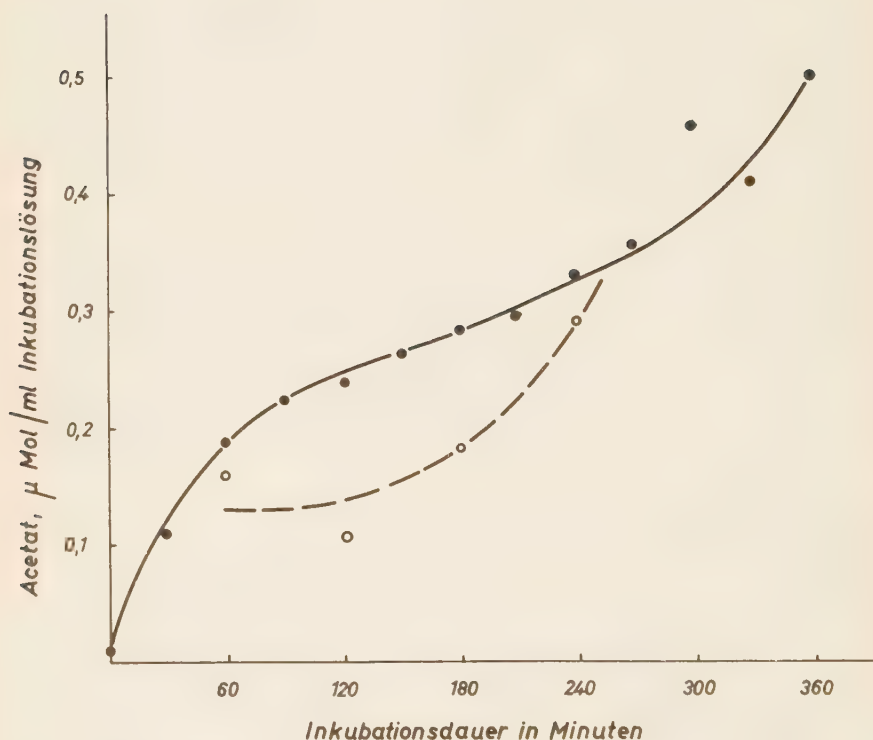


ABBILDUNG 13

Acetatstoffwechsel in Leberdünnschnitten.

3 Gramm Leberdünnschnitte wurden in 27 ml Krebs-Bikarbonat-Ringer-Lösung unter Carbogenbegasung bei 37°C inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurden je 0,6 ml (während der ersten zwei Stunden) bzw. 0,3 ml (während der letzten Stunden) des Inkubationsmediums entnommen, mit Perchlorsäure enteiweißt und auf Acetat untersucht. Exogenes Substrat wurde nicht zugesetzt. Die Werte der gestrichelten Kurve ist ein Ergebnis des schon in Abbildung 11 gezeigten Inkubationsversuches ohne Substratzusatz.

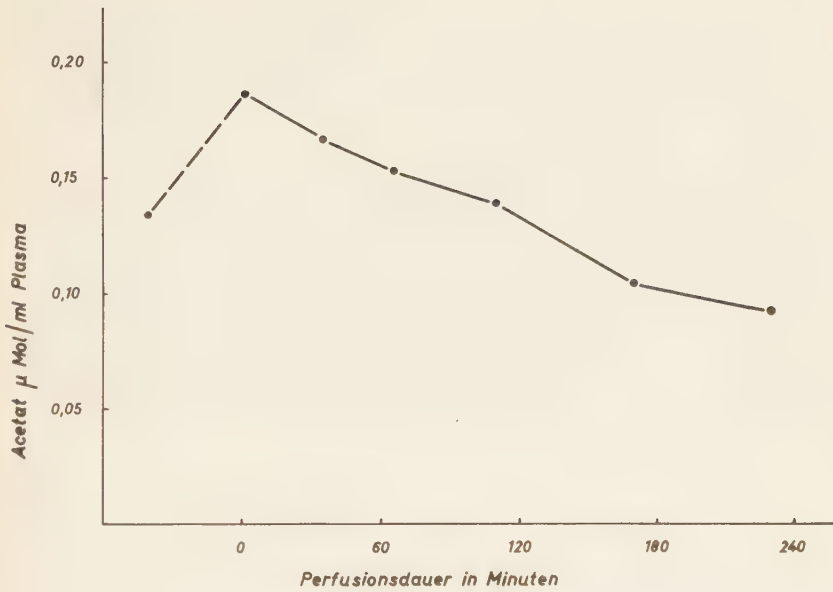


ABBILDUNG 14

Verhalten des Plasmaacetatspiegels während der Leberdurchströmung:

Versuchsanordnung vergl. Text.

- Acetat vor Anschluß der Leber,
- Acetatspiegel während der Durchströmung.

Exogen wurde kein Acetat zugesetzt.

V. ACETATSTOFFWECHSEL ROTER BLUTZELLEN

Bei Inkubationsversuchen mit roten Blutzellen stellte sich heraus, daß diese aus endogenen Quellen freies Acetat bilden. Sie könnten damit an der Aufrechterhaltung des Plasmaacetatspiegels beteiligt sein. Das Ergebnis von Versuchen, in denen mit Tyrodelösung gewaschene Rattenerythrocyten unter verschiedenen Bedingungen inkubiert wurden, zeigt Abbildung 15.

Eine ähnliche Acetatbildung wurde auch bei Inkubation von gewaschenen Rindererythrocyten, von unverändertem heparinisiertem Rattenblut (Anstieg des Acetatspiegels innerhalb 4 Stunden von $0,234 \mu\text{Mol/ml}$ auf $0,444 \mu\text{Mol/ml}$, bei 37°C und Carbogenbegasung), und bei Inkubation mechanisch hämolysierter Erythrocyten, denen DPN, CoA, Pyruvat und Glucose zugesetzt waren (2,4 ml gewaschene Rattenerythrocyten, 3,6 ml Tyrodelösung, 0,1 ml 0,1 M DPN-Lösung, 1 mg CoA, 2 mg Na-Pyruvat, und 6 mg Glucose wurden 1 Minute lang mit dem Ultra-Turrax aufgeschlossen und anschließend unter Carbogenbegasung bei 37°C inkubiert).

VI. ACETATSTOFFWECHSEL WEISSER BLUTZELLEN

Im Gegensatz zu den roten Blutzellen bilden menschliche Leukocyten unter vergleichbaren Bedingungen keine freie Essigsäure. In den in Abbildung 16 und 17 dargestellten Versuchen wurden menschliche Leukocyten aus dem Blut eines gesunden Spenders bzw. eines an einer chronischen myeloischen Leukämie ⁺⁺⁺ erkrankten in Krebs-Bikarbonat-Ringer-Lösung mit zugesetztem Pyruvat bei 37°C unter Carbogenatmosphäre inkubiert. Wie man sieht, unterscheidet sich der Acetat-Stoffwechsel normaler Leukocyten nicht von den Leukocyten eines an chronisch myeloischer Leukämie erkrankten Patienten.

Diese Versuche wurden durchgeführt, da sich andere Krebszellen, z. B. der Mäuseascites-Tumor, Typ Ehrlich, wie später noch ausführlich gezeigt wird, bezüglich des Acetatstoffwechsels von normalem Gewebe unterscheiden.

⁺⁺⁺ Herrn Chefarzt Prof. Dr. G. Begemann, Städt. Krankenhaus rechts der Isar, der mir freundlicherweise die Blutproben überließ, möchte ich an dieser Stelle nochmals ergebenst danken.

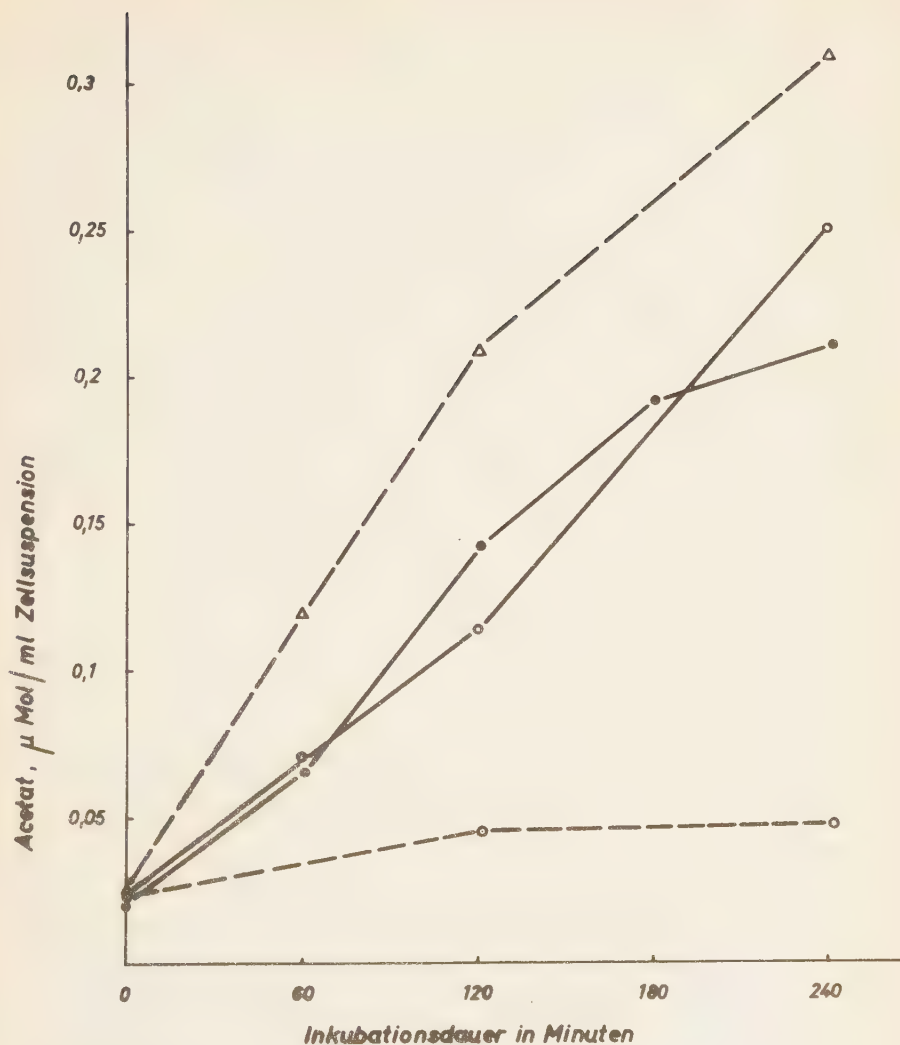


ABBILDUNG 15

Acetatbildung durch Rattenerithrocyten:

Gewaschene Rattenerithrocyten (40 Vol. %) wurden in Tyrodelösung (60 Vol. %) unter schütteln bei 37°C im offenen Erlmeyerkolben inkubiert und zu den angegebenen Zeiten Proben zur Acetatbestimmung entnommen. Als exogenes Substrat wurde zugegeben:

o — o 5,6 mM Glucose, Δ --- Δ 3,3 mM Na-Pyruvat,
 ● — ● ohne Substratzusatz, o ---- o N₂-Atmosphäre.

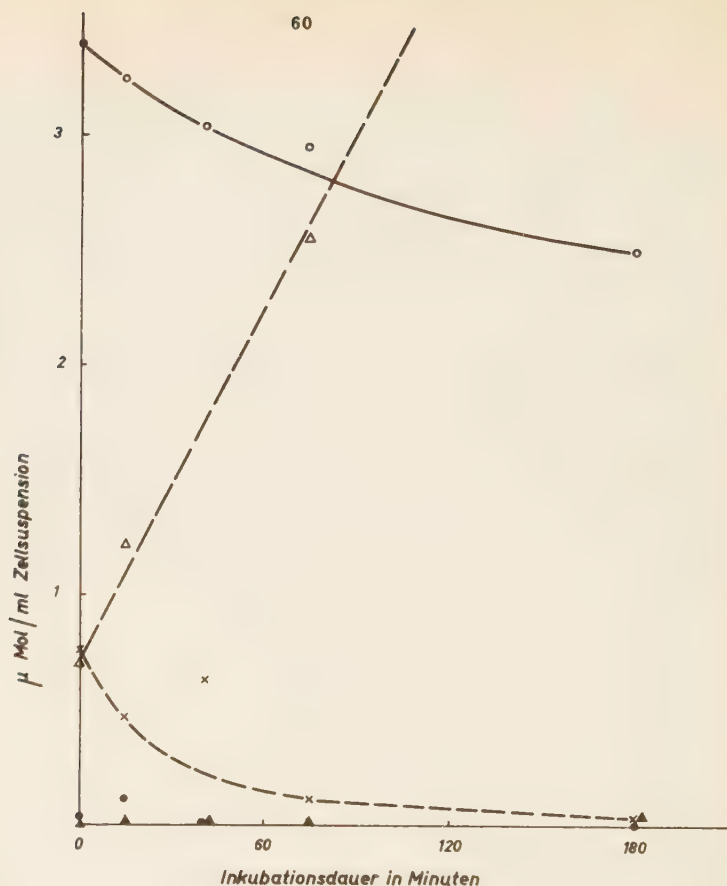


ABBILDUNG 16

Acetatstoffwechsel normaler menschlicher Leukocyten. 2,26 Mill. weiße Blutzellen (die Zellsuspension bestand aus 47 % Segmentkernige, 1 % Stabkernige, 3 % Monozyten, 2 % Lymphocyten, 1 % Eosinophile und 47 % Erythrozyten) wurden in 0,5 ml KBR-Lösung mit zugesetztem $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Pyruvat ($3,4\text{ }\mu\text{Mol/ml}$, $2,5 \times 10^5\text{ lpm/ml}$) unter Carbogenatmosphäre bei 37°C inkubiert. Zur angegebenen Zeit wurde im Inkubationsmedium bestimmt: o—o Pyruvat, enzymatisch nach BÜCHER (6), Δ — Δ Laktat enzymatisch mit LDH, Boehringer (9), x—x Glucose, enzym. Test der Fa.Boehringer (9), ●—● Acetat, $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$ $^{14}\text{CO}_2$ in Hyamin aufgefangen, gezählt im Scintillationszähler der Fa. Packard.

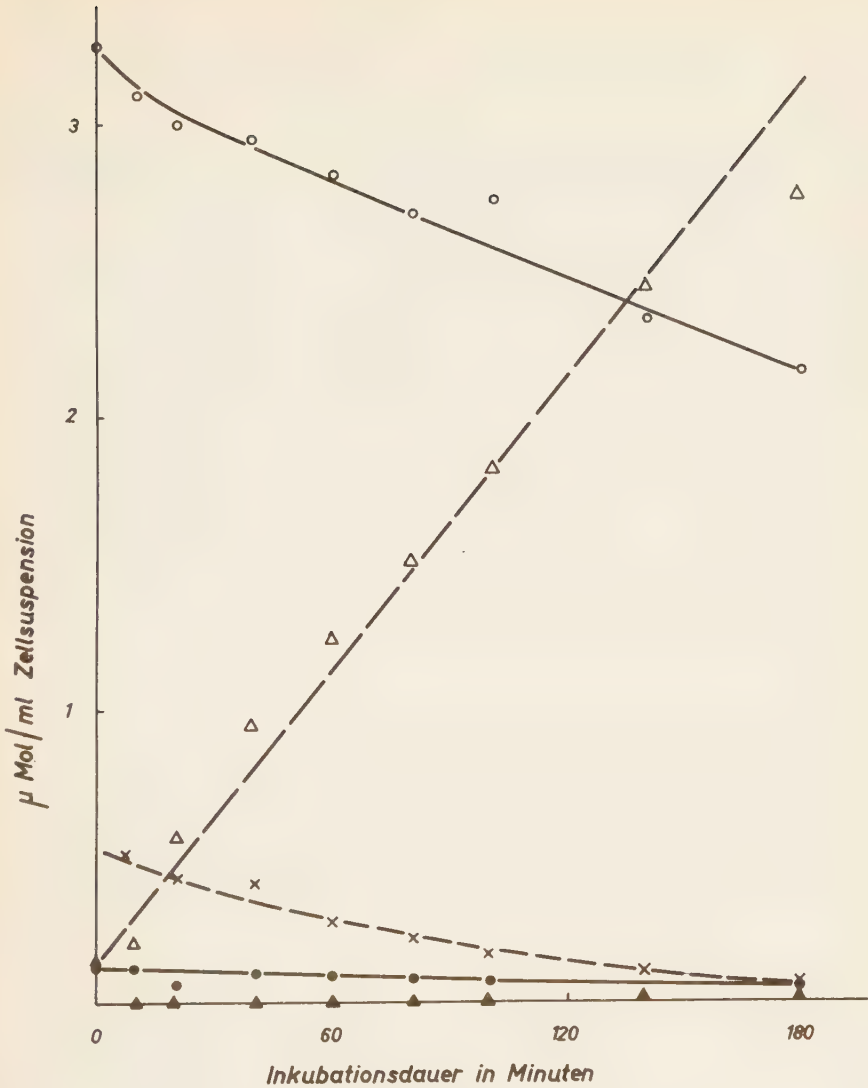


ABBILDUNG 17

Acetatstoffwechsel von Leukocyten bei chronisch myeloischer Leukämie:

2,8 Mill. weiße Blutzellen wurden inkubiert in 0,5 ml KBR-Lösung wie in Abbildung 16 beschrieben. Blutbild: 93000 Zellen/mm². Das Differentialblutbild zeigte alle Reifegrade der myeloischen Reihe vom Myeloblasten bis zum Segmentkernigen.

Zur Technik der Inkubationsversuche mit weißen Blutzellen ist nachzutragen:

a) Isolierung der weißen Blutzellen: Die Isolierung der Leukocyten aus der heparinisierten Blutprobe des an Leukämie erkrankten Patienten war nach Zentrifugation in einem engen Zentrifugenröhrchen durch Abheben mit einer fein ausgezogenen Pipette möglich.
Die Leukocyten aus Normalblut wurden aus ca. 60 ml heparinisiertem Blut (Differential-Blutbild: 77 % Segm., 4 % Stab., 5 % Mono., 16 % Lymph.) nach der von H. EHRHART angegebenen Methode isoliert (26)⁺⁺⁺. Dabei wurde das Blut zentrifugiert, um die zelligen Bestandteile von Plasma und die roten von den weißen Blutzellen in verschiedene Schichten abzutrennen. Das so schichtweise aufgetrennte Blut wurde äußerst behutsam durch von unten in das Zentrifugenglas langsam zufließendes Quecksilber in eine auf das Zentrifugenglas aufgesetzte Glaskapillare gehoben und durch diesen abtropfen lassen. Die in dem Zentrifugenglas nur Bruchteile eines Millimeters dicke Schicht der weißen Blutzellen wurde bei der Passage durch die Glaskapillare stark auseinandergezogen und konnte so in einigen Tropfen isoliert von den roten Blutzellen aufgefangen werden. Von der Blutentnahme bis zum Beginn der Inkubation vergingen weniger als 60 Minuten.

b) Inkubationstechnik: Die mit Krebs-Bicarbonat-Ringer verdünnte Leukocytensuspension (0,5 ml) wird mit 2^{14}C -Pyruvat in dicht mit Gummistopfen verschlossenen 10 ml-Zentrifugengläsern unter Carbogenatmosphäre im Wasserbad bei 37°C geschüttelt. Unmittelbar vor Beendigung der Inkubation wird durch eine dünne durch den Gummistopfen gestochene Kanüle in einen in das Zentrifugenglas hängenden kleinen Glaseinsatz Hyamin (0,3 ml) gespritzt und anschließend die Inkubation durch Einspritzen von 4 % Perchlorsäure (1 ml) beendet. Das noch geschlossene Zentrifugengläschen wird 30 Minuten in ein Eisbad gestellt. Während dieser Zeit diffundiert das durch die Perchlorsäure freigesetzte CO_2 bzw. $^{14}\text{CO}_2$ in das Hyamin. Der Glaseinsatz wird herausgenommen und samt Inhalt in das Meßgefäß mit der Scintillationsflüssigkeit versenkt. Ähnliche für Isotopenversuche verwandte Glasgefäße sind an anderer Stelle genauer beschrieben (109).

⁺⁺⁺ Für die hilfsbereite Anweisung und Unterstützung möchte ich Herrn Priv. Doz. Dr. H. Ehrhart[~] und Herrn Dr. Dörfler, I. Medizin. Universitätsklinik, München, vielmals danken.

VII. ACETATSTOFFWECHSEL IN TUMORZELLEN ⁺

Bei den Untersuchungen des Acetatspiegels in Mäuseascites-Tumor, Typ Ehrlich ⁺⁺, fiel auf, daß in einem einige Stunden im Eisbad aufbewahrten Tumor ein Acetatspiegel von $0,400 \mu\text{Mol/ml}$ gemessen wurde, während Bestimmungen von frisch punktiertem Ascites-Tumor Werte von ungefähr $0,200 \mu\text{Mol/ml}$ ergaben. Unter der Erwartung, daß die freie Essigsäure durch die Tumorzellen gebildet wird, wurden gewaschene Tumorzellen unter ähnlichen Bedingungen inkubiert, wie bei den Inkubationsversuchen mit roten Blutzellen beschrieben wurde. Den Verlauf des Acetatspiegels im Inkubationsmedium eines solchen Versuches zeigt Abbildung 18. Wie man sieht, geben frische, mehrmals mit Ringerlösung gewaschene Ascites-Tumorzellen, die unter Carbogenatmosphäre in KBR-Puffer geschüttelt werden, freies Acetat an das Medium ab. Da dem Ansatz kein Substrat zugesetzt worden war, mußte die Essigsäure aus endogenen Quellen entstanden sein, z. B. aus dem in den gewaschenen Zellen vorhandenen Laktat.

Die Acetatbildung läßt sich im Gegensatz zu den Ergebnissen der Inkubationsversuche mit roten Blutzellen, wie der in Abbildung 19 dargestellte Versuch zeigt, durch Zugabe von Pyruvat beträchtlich steigern. Rund ein Drittel des zugegebenen Pyruvats wird innerhalb vierzig Minuten in Essigsäure umgewandelt. Bei der Inkubation von Pyruvat in KBR-Puffer und in einen partikelfreiem Extrakt aus gewaschenen Tumorzellen war kein Auftreten von freier Essigsäure zu beobachten.

Um näheren Aufschluß über die quantitativen Umsetzungen des Pyruvats zu erhalten, wurde der Versuch mit $2\text{-}^{14}\text{C}$ -markiertem Pyruvat wiederholt (Abbildung 20). Dabei wurden ähnliche Glasgefäße wie bei den Inkubationsversuchen der Leukocyten verwendet, für jeden Zeitwert ein eigener Inkubationsansatz. Das über den Citronensäurecyclus zu $^{14}\text{CO}_2$ oxydierte $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Pyruvat konnte als im Hyamin aufgefangene Radioakti-

⁺ Die Untersuchung des Stoffwechsels der freien Essigsäure in Tumorzellen war eine Gemeinschaftsarbeit mit Herrn Dr. D. HEPP. An dieser Stelle werden nur die vom Verfasser selbst durchgeführten Untersuchungen beschrieben. Über das Resultat der gesamten Arbeit wurde an anderer Stelle berichtet (37, 38).

⁺⁺ Der Tumor wurde freundlicherweise von Herrn Professor H. WRBA, Pathol. Institut der Universität München, zur Verfügung gestellt. Er wurde von Herrn Dr. D. HEPP, II. Med. Klinik der Universität München, in 34 Passagen auf NMRI-Mäusen (Lieferant W. Gassner, München-Ottobrunn) weitergezüchtet und zeigte von Passage zu Passage keine nennenswerten Unterschiede in Zellzahl und Zellvolumen.

vität bestimmt werden. Das zu ^{14}C -Acetat umgesetzte 2- ^{14}C -Pyruvat wurde durch die Mikrodifffusion isoliert und durch Messung der Radioaktivität im Destillat der Mikrodifffusion bestimmt. Da Pyruvat und Laktat, beides im sauren Milieu flüchtige Substanzen, ebenfalls durch die Mikrodifffusion mit der Essigsäure abgetrennt werden, konnte zur quantitativen Auswertung des Versuches nur die Radioaktivitätsbestimmung des Wertes nach 160 min. Inkubationsdauer verwendet werden. Zu diesem Zeitpunkt war enzymatisch kein Pyruvat und kein Laktat mehr im Inkubationsmedium zu messen.

Die Radioaktivitätsbestimmung im Destillat der Mikrodifffusion dieses Zeitwertes ergab umgerechnet auf 1 ml Inkubationsmedium $9,9 \times 10^4$ dpm. Da $3,26 \mu\text{Mol/ml}$ 2- ^{14}C -Pyruvat mit einer Aktivität von $6,00 \times 10^5$ dpm/ml eingesetzt worden waren, ergab dies $0,675 \mu\text{Mol/ml}$ ^{14}C -Acetat. (Dabei ist berücksichtigt, daß durch die Mikrodifffusion nur 80 % der eingesetzten Essigsäure abgetrennt werden. - Die Zählausbeuten bei der Bestimmung des Destillats lagen in gleicher Höhe mit wässrigen ^{14}C -Standardlösungen, so daß auf eine Korrektur über einen "internal standard" verzichtet werden konnte.)

Demnach erscheinen in diesem Versuch 23 % des Pyruvats als Acetat, etwa 45 % wurden als $^{14}\text{CO}_2$ erfaßt.

Eine Bestätigung dieses Ergebnisses liefert der parallel mit Tumorzellen der gleichen Ernte durchgeführten Vergleichsversuch, bei dem kein Substrat angeboten wurde (Abbildung 18). Die Differenz des dort ohne Pyruvatzusatz in 160 Min. gebildeten Acetats und der Acetatmenge, welche bei Pyruvatzusatz freigesetzt wurde (Versuch Abbildung 20), entspricht ziemlich genau dem gemessenen ^{14}C -markierten Acetat.

Wie in Abbildung 19 und 20 auffällt, kommt es nach Pyruvatzusatz zu einer vorübergehenden Anhäufung von Laktat. Offenbar sind die Tumorzellen nicht in der Lage, die im Überschuß angebotene Menge Pyruvat mit genügender Schnelligkeit zu oxydieren, so daß ein Teil zunächst in Laktat umgewandelt wird. Diese Erscheinung entspricht der bekannten hohen aeroben Glycolyse der Ascites-Tumorzellen (1).

Inkubiert man die Ascites-Tumorzellen unter Nitrogenatmosphäre (95 % N_2 , 5 % CO_2), so findet durch Pyruvat keine über die Leerproduktion hinausgehende Acetatbildung statt (Abbildung 21). Unter anaeroben Bedingungen wird das gesamte Pyruvat in Laktat umgewandelt. Aus diesem Versuch kann geschlossen werden, daß die Acetatbildung aus Pyruvat nicht auf dem Weg einer Dismutation gemäß Gleichung 25



zustandekommt, wie dies in Muskelgewebe beobachtet wurde (52).

Eine mengenmäßig gleiche Acetatfreisetzung wie eine Suspension gewaschener Tumorzellen zeigte frisch punktierter, nativ inkubierter Ascites-Tumor (Abbildung 22). Diese wahrscheinlich auch bei tumortragenden Mäusen im Ascites anfallende Essigsäure beeinflusst den Blutacetatspiegel nicht.

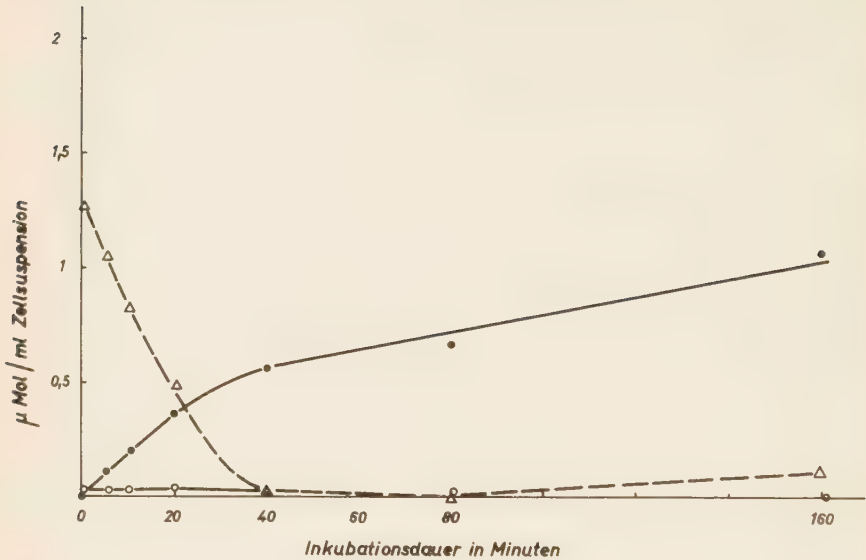


ABBILDUNG 18

Acetatstoffwechsel von Ascites-Tumorzellen

Ca. 40 mg Protein entsprechende Menge gewaschener Ascites-Tumorzellen werden pro ml KBR-Puffer ohne Substratzusatz bei 37°C unter Carbogenbe-
gasung in einem Erlmeyer-Kolben inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten
wird ein Teil der Zellsuspension entnommen und auf Acetat ●—●, Lak-
tat Δ ---- Δ und Pyruvat o—o untersucht. (Dieser Versuch ist der Ver-
gleichsversuch ohne Substratzugabe zu dem in Abbildung 20 dargestellten In-
kubationsversuch, bei dem Pyruvat zugesetzt wurde).

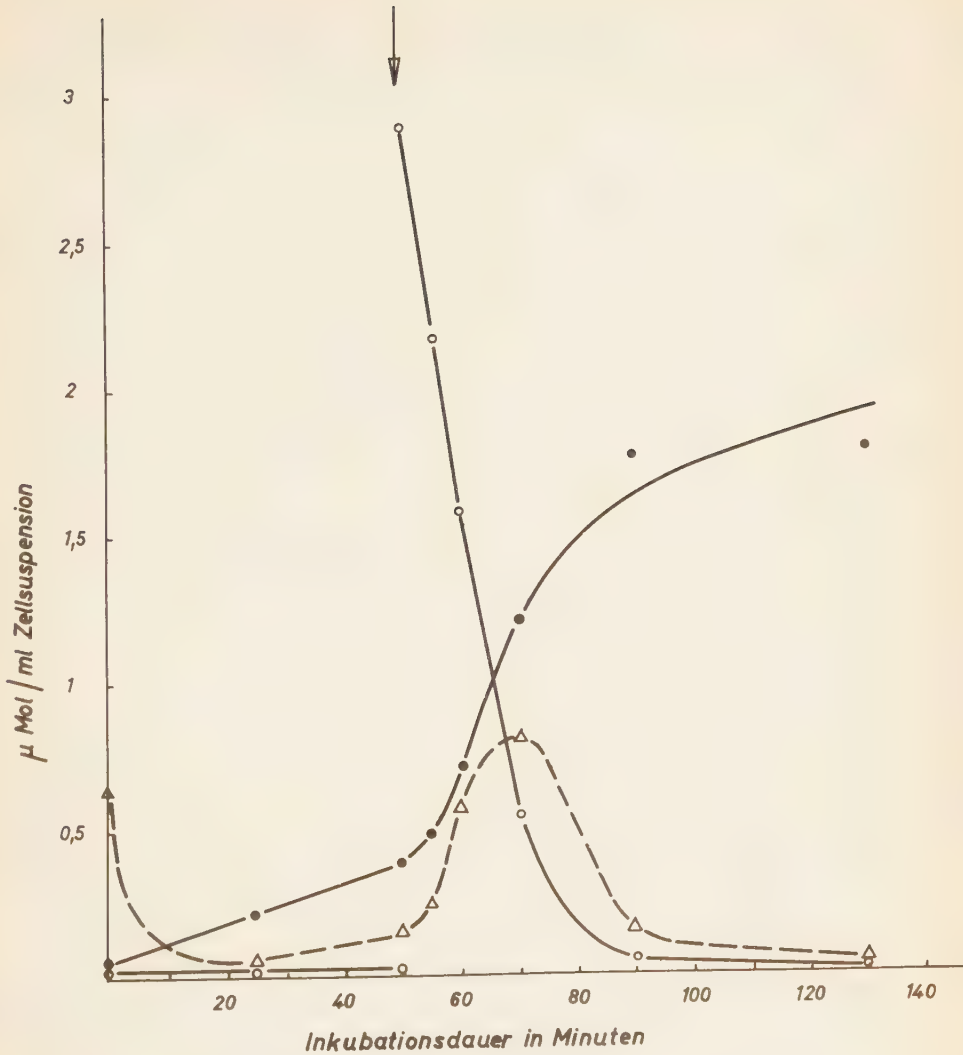


ABBILDUNG 19

Acetatstoffwechsel von Ascites-Tumorzellen
Ca. 40 mg Protein entsprechende Menge gewaschener Tumor-Zellen pro ml KBR-Lösung wurden ohne Substratzusatz unter Carbogen-Atmosphäre inkubiert.

Nach Inkubationsdauer von 50 min. Zugabe von $2,9 \mu\text{Mol/ml}$ Pyruvat (Pfeil) weiterhin Carbogen-Atmosphäre.

● — ● Acetat, ○ — ○ Pyruvat, Δ — — — Δ Laktat.

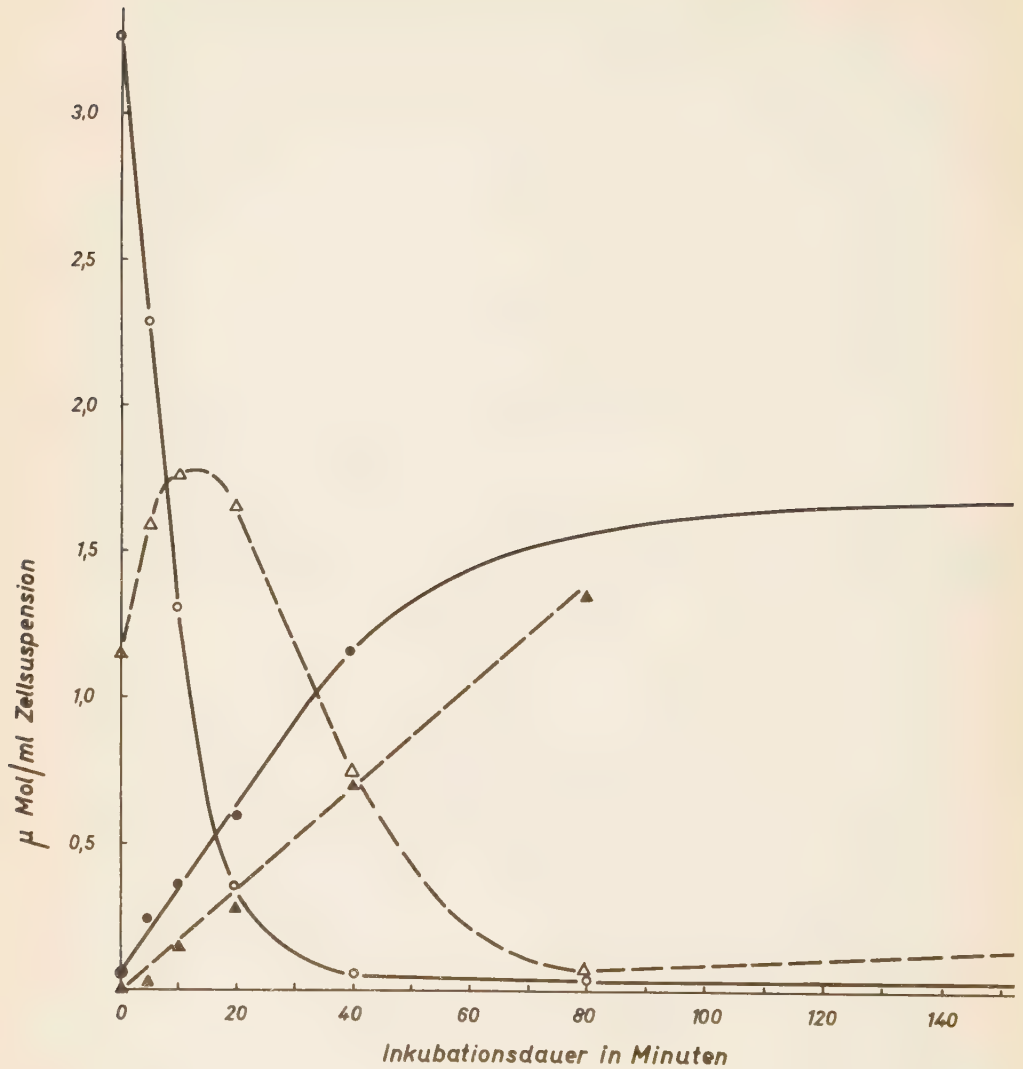


ABBILDUNG 20

Acetatstoffwechsel von Ascites-Tumorzellen

Ca. 40 mg Protein entsprechende Menge gewaschener Ascites-Tumorzellen wurden in Einzelansätzen in je 1 ml KBR-Puffer mit $3,26 \mu\text{Mol/ml}$ $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Pyruvat bei 37°C unter Carbogenatmosphäre inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wird bestimmt: ●—● Acetat, o—o Pyruvat, Δ----Δ Laktat, ▲----▲ $^{14}\text{CO}_2$.

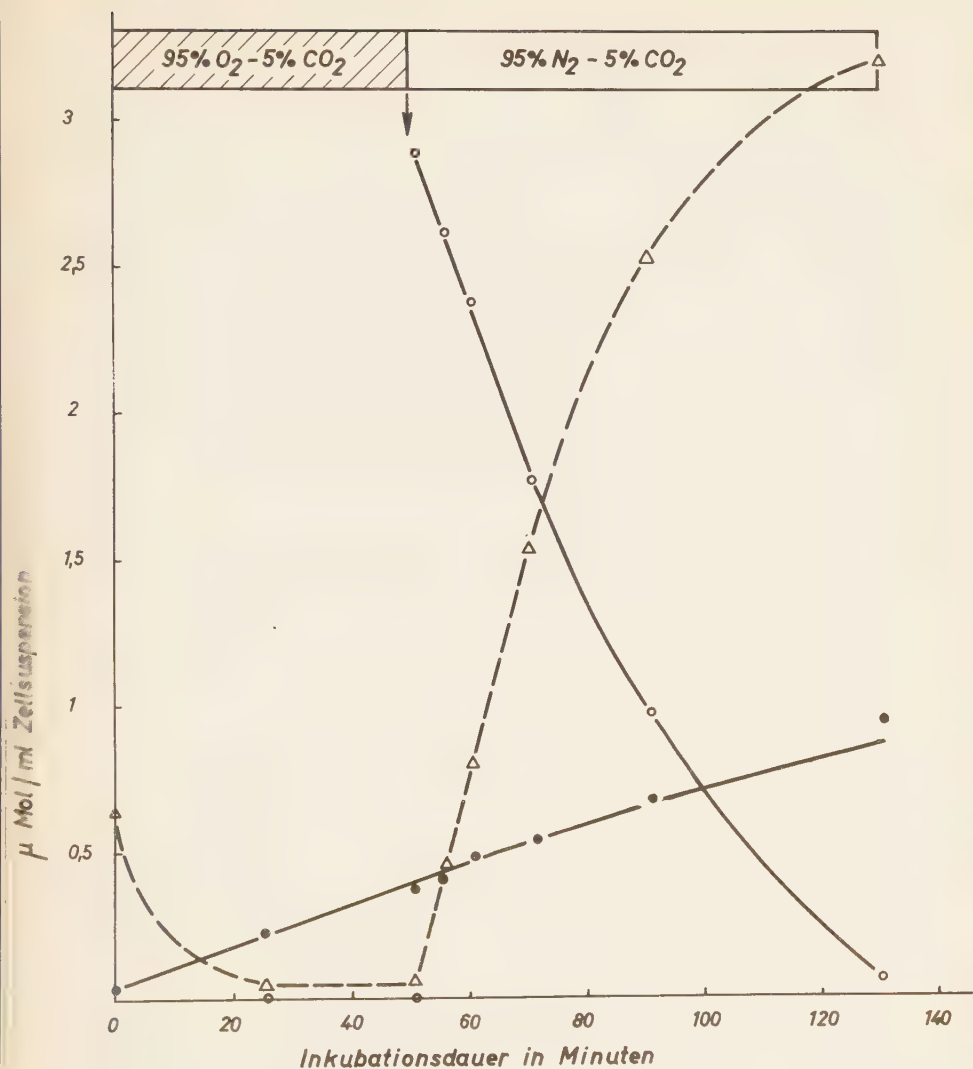


ABBILDUNG 21

Acetatstoffwechsel von Ascites-Tumorzellen, anaerober Versuch:

Ca. 40 mg Protein entsprechende Menge gewaschener Tumor-Zellen pro ml KBR-Lösung werden ohne Substratzusatz unter Carbogenatmosphäre bei 37°C inkubiert.

Nach einer Inkubationsdauer von 50 Min. Zugabe von 2,9 $\mu\text{Mol/ml}$ Pyruvat (Pfeil). Weiterhin Nitrogen-Atmosphäre. (Parallelversuch zu Abbildung 19.)

● — ● Acetat, ○ — ○ Pyruvat, Δ — — — Δ Laktat.

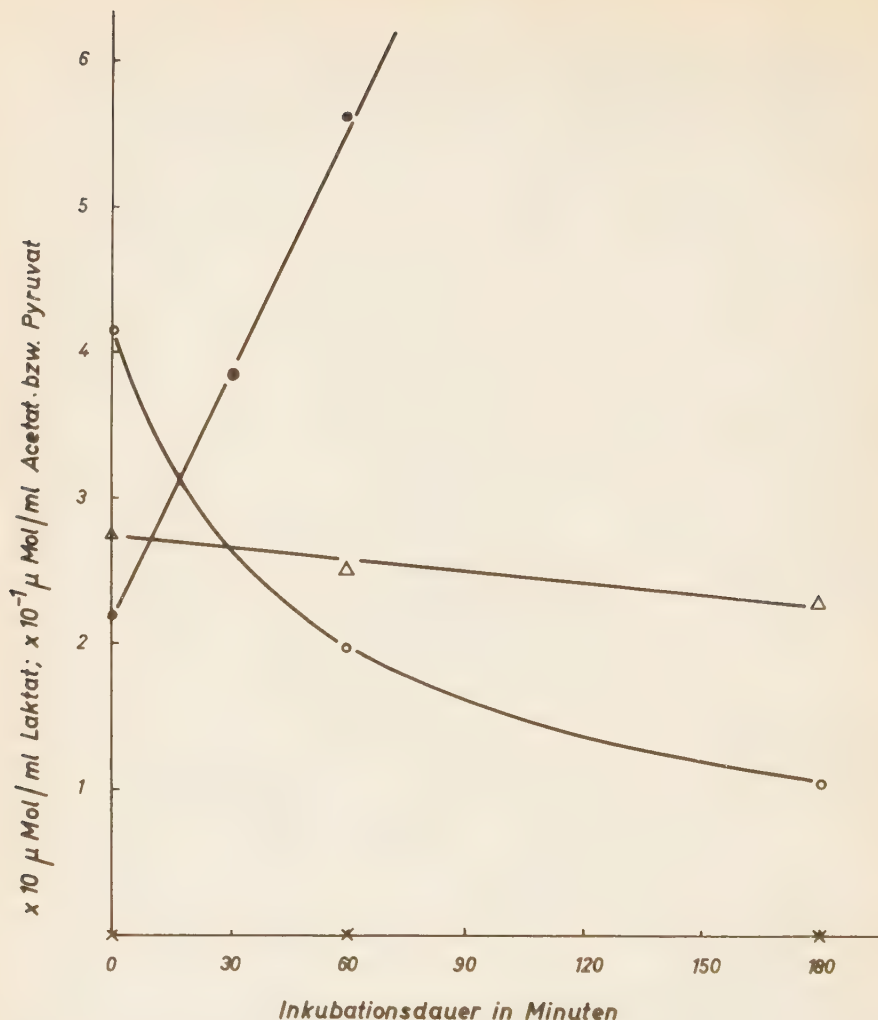


ABBILDUNG 22

Acetatfreisetzung von nativem Mäuseascites-Tumor, Typ Ehrlich:

Frischer Ascites-Tumor, wie er bei der Punktion gewonnen wurde, wurde unter Carbogenbegasung bei 37°C in einem Erlmeyer-Kolben unter leichtem Schütteln inkubiert. Zur angegebenen Zeit wurden Proben entnommen, und auf Acetat (●-----●), Pyruvat (o-----o), Laktat (Δ-----Δ) und Glucose (x-----x) untersucht.

Der Ascites-Tumor (36), der 9 Tage nach Implantation abpunktiert wurde, hatte einen Hämatokritwert von 35. Mit einer Zellzahl von $500\,000/\text{mm}^3$ entsprach er ungefähr den Zellsuspensionen der oben beschrie-

VIII. ACETYL-COENZYM A-DEACYLASE

In den vorigen Kapiteln wurde die Essigsäure als regelmäßiger Bestandteil des Blutes und der Gewebe des Menschen und einiger Säugetiere nachgewiesen. Auch für ihre Nettobildung konnten einige Gewebe, die roten Blutzellen, gealtertes Lebergewebe und Ascites-Tumorzellen verantwortlich gemacht werden. Zur Klärung des Reaktionsweges, der zur freien Essigsäure führt, erschien es wichtig, das Vorkommen und die Aktivität der Acetyl-CoA-Deacylase zu untersuchen, des Enzymes, das die in ihrer Entstehungsweise wohlbekannte, aktivierte Essigsäure hydrolytisch in Acetat und Coenzym A spaltet. Den Untersuchungen lag die Fragestellung zu Grunde, wieweit die stationäre Acetat-Konzentration und die Acetatnettbildung von dem Gegenspiel der Acetat-Thiokinase, des Enzymes das Acetat mit ATP und CoA zu Acetyl-CoA aktiviert, und der Acetyl-CoA-Deacylase abhängig ist (vergl. Abbildung 23).

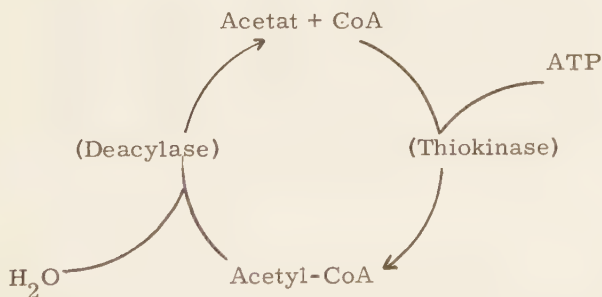


ABBILDUNG 23
(vergl. Text)

Kreislauf des Acetates:

1. AKTIVITÄT DER DEACYLASE IN VERSCHIEDENEN RATTEN-ORGANEN

Abbildung 24 zeigt eine Gegenüberstellung der Aktivität der Acetyl-CoA Deacylase und des Gehaltes an Acetat in verschiedenen Rattenorganen. Die Absolutwerte dieser mit dem DPI-Test bestimmten Enzymaktivitäten sind mit den auf Seite 24 diskutierten Vorbehalten zu bewerten. Aktivitätsbestimmungen mit dem katalytischen Acetat-Test ergaben trotz höherer Reaktionstemperaturen (37°C) bis zu 50 % tiefer liegende Werte (vergl. Abb. 26). Die Ergebnisse der Abbildung 24 lassen jedoch einen Zusammenhang zwischen der Enzymaktivität der Deacylase und des Acetatgehaltes in den untersuchten Rattenorganen vermuten.

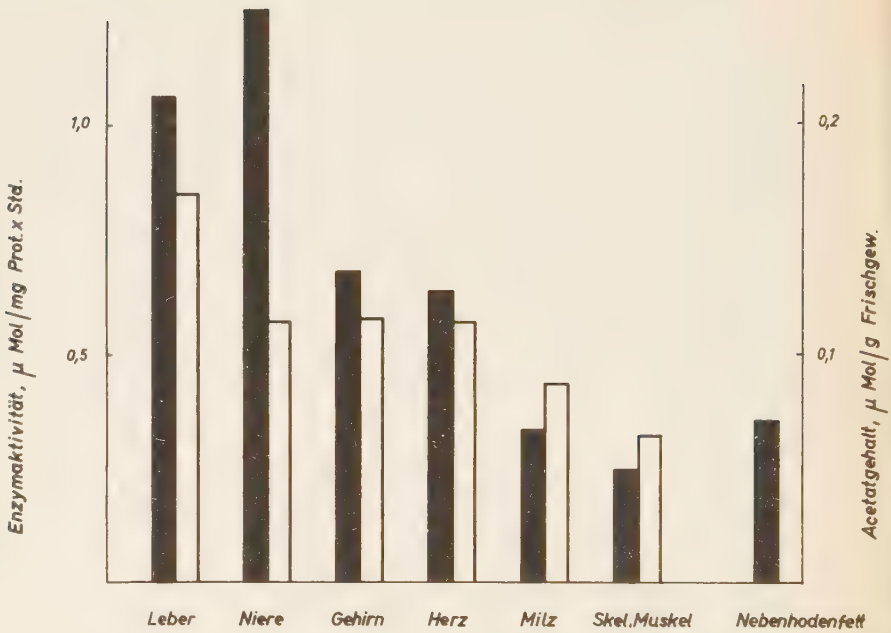


ABBILDUNG 24

Gegenüberstellung der Aktivität an Acetyl-CoA-Deacylase und des Gehalts an freier Essigsäure in Rattenorganen: Die Enzymaktivität (dunkle Säulen) wurde mit dem DPI-Test als μ Mol freigesetzte SH-Gruppen pro mg Protein und Stunde bei 25°C gemessen. Der Acetatwert (helle Säulen) ist das arithmetische Mittel der in Tabelle 4, Seite 43 angegebenen Werte. (Vom Nebenhodenfett liegt keine Acetatbestimmung vor.)

2. LOKALISATION UND SUBSTRATAFFINITÄT DER DEACYLASE IN DER LEBERZELLE

Die Enzyme der Fettsäureoxydation und die Pyruvatoxydase, beides wohl die wichtigsten Enzymsysteme zu Bildung von aktivierter Essigsäure, sind im mitochondrialen Raum der Zelle lokalisiert. Dort fällt also das meiste Acetyl-CoA an. Es existieren mehrere Hypothesen, um den Mechanismus des Übertrittes des mitochondrialen Acetyl-CoA in das Cytoplasma (97) zu erklären, wo es z. B. zur Fettsäuresynthese benötigt wird. Darauf soll in der Diskussion noch einmal eingegangen werden. Eine Möglichkeit ist die Wirkung der Acetyl-CoA-Deacylase in Verbindung mit der Acetat-Thiokinase (111), wobei das in den Mitochondrien angelieferte Acetyl-CoA durch eine mitochondriale Deacylase gespalten wird und das freie Acetat die Mitochondrienmembran passieren kann. Im Cytoplasma würde die Essigsäure durch die Thiokinase wieder aktiviert, um so zu höheren Fettsäuren aufgebaut werden zu können.

Die Verteilung der Acetyl-CoA-Deacylase innerhalb der Leberzelle, die schematisch in Abbildung 25 dargestellt wird, läßt an diesen Transportmechanismus denken. Der Gesamtaktivität ist die spezifische Aktivität gegenübergestellt. Die hohe spezifische Aktivität im Extrakt mehrmals gewaschener Mitochondrien zeigt die Lokalisation einer Deacylase auch in den Mitochondrien an. Es handelt sich dabei wahrscheinlich um ein mit der extramitochondrialen Deacylase identisches Enzym, da, wie Abbildung 26 zeigt, die Substratsättigungskurven der cytoplasmatischen und mitochondrialen Deacylase die gleiche Substrataffinität zeigen (Michaeliskonstanten: $K_m = 0,4 - 0,7 \times 10^{-4}$).

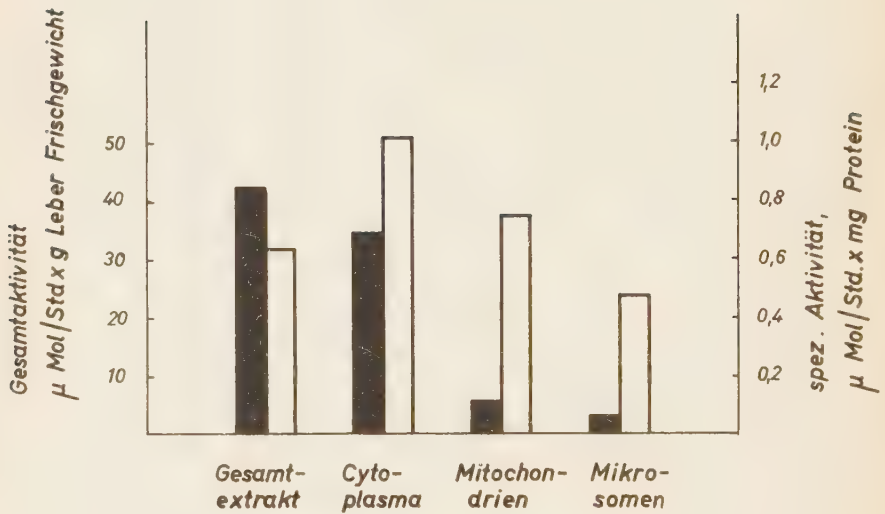


ABBILDUNG 25

Verteilung der Acetyl-CoA-Deacylase in der Leberzelle:

Die Zellaufschlüsse wurden mit Acetyl-CoA ($6,5 \cdot 10^{-4} \mu\text{M}$) bei 37°C inkubiert. Die Geschwindigkeit der Acetatfreisetzung, bezogen auf 1 g Leber Frischgewicht ist als Gesamtaktivität (dunkle Säulen) auf der linken Ordinate, die auf 1 mg Protein bezogene Acetatfreisetzung als spezifische Aktivität (helle Säulen) auf der rechten Ordinate aufgetragen.

Die Essigsäure wurde mit dem katalytischen Test (vergl. S. 25) bestimmt. Die Fraktionierung des Lebergewebes erfolgte nach HOGEBOM (40) durch mechanischen Aufschluß des Gewebes mit einem Homogenisator nach POTTER in 0,25 M Saccharose und anschließender Trennung der Zellpartikel durch fraktionierte Zentrifugation.

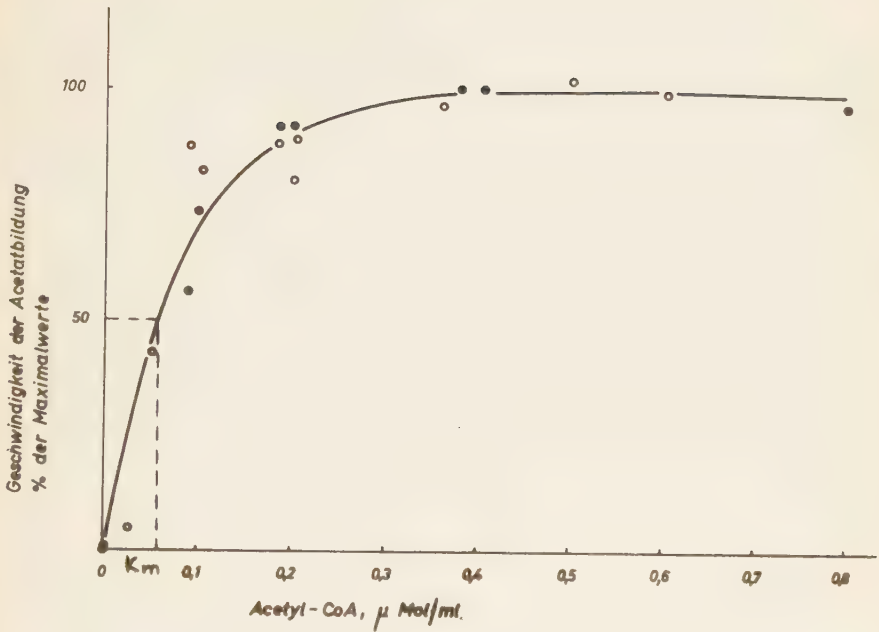


ABBILDUNG 26

Substratsättigungskurve der cytoplasmatischen und der mitochondrialen Acetyl-CoA-Deacylase der Leberzelle; Steigende Mengen an Acetyl-CoA wurden Extrakten aus Cytoplasma (●—●) und Mitochondrien (o — o) angeboten, und die Geschwindigkeit der Acetatfreisetzung mit dem katalytischen Acetat-Test (vergl. S. 25) gemessen. Die Werte stammen aus Versuchen mit drei voneinander unabhängigen Leberaufschlüssen.

Aus der Kurve ergibt sich die Michaeliskonstante für Acetyl-CoA:

$K_m = 0,5 \times 10^{-4}$.

3. AKTIVITÄT DER DEACYLASE IN GEALTERTEM LEBERGEWEBE

Bei der Inkubation von Leberdünnschnitten (Abbildung 13, Seite 56) wurde mit fortschreitender Inkubationszeit eine zunehmende Acetatfreisetzung beobachtet. Eine Erklärung dafür könnte die Verschiebung des Verhältnisses zwischen Acetataktivierung und Acetyl-CoA-Spaltung zu Gunsten des letzteren sein.

De DUVE konnte bei Ischämie der Rattenleber eine Freisetzung von hydrolytischen Gewebsenzymen des Protein, Nucleinsäure- und Mucopolysaccharidabbaus, nachweisen (24), die in besonderen Zellorganellen, den Lysosomen (25) untergebracht sind.

Eine Aktivitätszunahme der Acetyl-CoA-Deacylase während einer 4 stündigen Ischämie der Rattenleber konnte nicht festgestellt werden: Eine frisch entnommene Rattenleber wurde in einer auf 37°C erwärmten Ringerlösung 4 Stunden ohne zusätzliche Sauerstoffzufuhr liegen gelassen. Stündlich vorgenommene Deacylase-Bestimmungen mit dem DPI-Test (vergl. Seite 40) ergaben annähernd den gleichen Wert wie die Aktivitätsbestimmung in dem in Äthernarkose resezierten und sofort in flüssiger Luft geworfenen Leberlappen (0,8 - 1,0 $\mu\text{Mol/mg Protein x Stunde}$).

4. ACETYL-CoA-DEACYLASE IN TUMORZELLEN

Zu den Untersuchungen der Acetyl-CoA-Deacylase in den Ascites-Tumorzellen, Typ Ehrlich, sollen an dieser Stelle die Ergebnisse nur zahlenmäßig genannt werden. Ihre ausführliche Diskussion im Zusammenhang mit den von D. HEPP durchgeführten Untersuchungen erfolgt im nächsten Kapitel dieser Arbeit (vergl. auch (36, 37)).

Über die Bestimmung der freien Essigsäure mit dem katalytischen Acetat-Test ergab sich als spezifische Aktivität des Enzyms in Ascites-Tumorzellen: 0,63 $\mu\text{Mol/mg Protein x Stunde bei } 37^{\circ}\text{C}$. Die ebenso durchgeführten Substratsättigungskurven entsprachen weitgehend denen der Rattenleber (Michaelis-Konstante, $K_m = 0,4 - 0,7 \times 10^{-4}$, vergl. Abbildung 26).

D. DISKUSSION

ACETATSTOFFWECHSEL IM GESUNDEN TIERKÖRPER

Freie Essigsäure wurde als regelmäßiger Bestandteil des Blutes und der Gewebe des Menschen und einiger Säugetiere nachgewiesen. Sieht man von den Wiederkäuern ab, bei denen das im Pansen durch Mikroorganismen entstehende Acetat ein Hauptsubstrat des energieliefernden Stoffwechsels darstellt, so erhebt sich die Frage, auf welche Weise bei anderen Säugetieren und beim Menschen die beobachteten, konstanten Acetatsmengen aufrecht erhalten werden. Nach eigenen Untersuchungen, die im wesentlichen eine Bestätigung der von LUNDQUIST (61) beschriebenen Ergebnisse waren, erscheint es wenig wahrscheinlich, daß die Art der Ernährung den Acetatstoffwechsel beeinflußt. Weder Fasten noch reichliche Fettzufuhr, ja nicht einmal orale Aufnahme größerer Mengen von Essigsäure veränderten den Blutacetatspiegel. Nach den Ergebnissen der Leberdurchströmungsversuche, bei denen klar gezeigt werden konnte, daß die Rattenleber sehr leicht große Mengen Acetat aufnehmen kann, darf wohl angenommen werden, daß die Ausschöpfung der Essigsäure aus dem Pfortaderblut schneller erfolgt als ihre Resorption aus dem Magen-Darm-Trakt.

Bei Wiederkäuern trifft diese Annahme nicht zu, wie der Anstieg des Blutacetatspiegels kurz nach Nahrungsaufnahme zeigt. Das wesentlich größere Angebot an Acetat, sowie dessen bessere Resorption durch den um ein Mehrfaches längeren Magen-Darm-Trakt scheinen zur Anlieferung so großer Mengen von Acetat zu führen, daß die Leistungsfähigkeit der Leber überfordert ist. Ein Teil der Essigsäure passiert die Leber unverändert und gelangt in den großen Blutkreislauf. Ein ähnlicher Fall liegt vor nach dem Genuß größerer Mengen Alkohol. Wie allgemein bekannt ist, erfolgt dessen Resorption sehr rasch. Große Mengen Alkohol durchströmen die Leber. Er wird durch DPN-abhängige Reaktionen über Acetaldehyd zu Acetat oxydiert. Geschwindigkeitsbestimmender Schritt ist dabei nach H. BÜTTNER (17) die Oxydation zu Acetaldehyd durch die Acetaldehyddehydrogenase. Da im Lebervenenblut nach Alkoholbelastung vermehrt Acetat auftritt, muß die Oxydation des Äthanol zu Acetat rascher erfolgen, als dessen weitere Reaktion. Das Acetat aktivierende Enzym, die Thiokinase, ist nach NUMA et al. (78 a) in der Leber in höherer Aktivität vorhanden als das Enzym das durch die Bildung von Malonyl-CoA aus Acetyl-CoA und CO_2 den Aufbau höherer Fettsäuren einleitet. Durch diese letztere Reaktion wird demnach die Eingaugeschwindigkeit des Acetats in die Fettsäuren bestimmt. Daß die Leber tatsächlich das Schlüsselorgan des Alkoholstoffwechsels ist, zeigen sehr schön auch Versuche von LUNDQUIST (62). Er untersuchte während einer Dauertropfinfusion von Äthanol den Alkohol- und Acetatspiegel des venösen Leberblutes, das er durch einen in der Vena Cava vorgeschobenen Katheter aus der Vena Hepatica über die Versuchs-

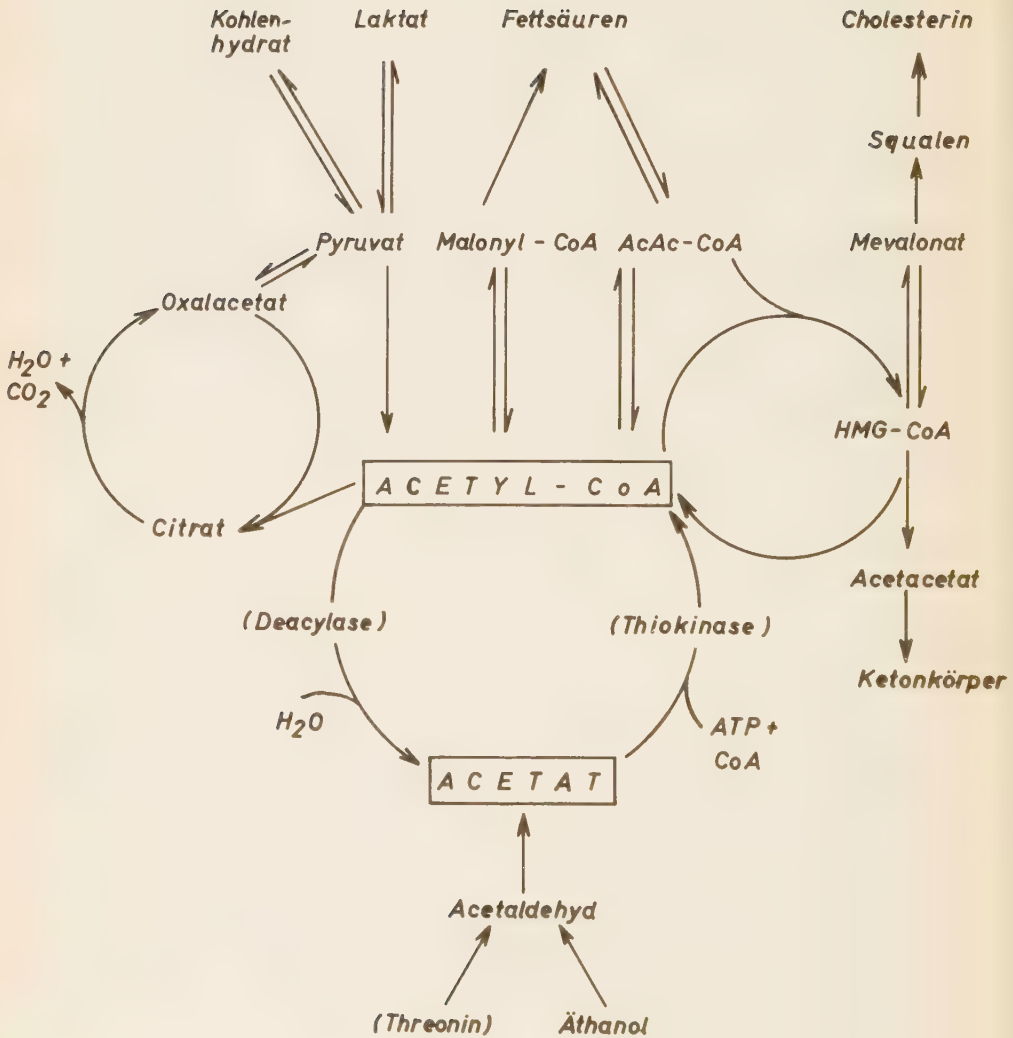


ABBILDUNG 27

Hauptwege des Acetyl-CoA und Acetats in der Leber

zeit hin entnahm. Der Vergleich des Lebervenenblutes mit arteriellem Blut ergab, daß 50 bis 100 % des umgesetzten Alkoholes als Acetat im Lebervenenblut erscheinen.

Sieht man von diesem speziellen Fall des Alkohols als exogene Acetatsquelle ab, so muß man annehmen, daß die Essigsäure endogen als normales Zwischenprodukt des Zellstoffwechsels entsteht. Als bekannte unmittelbare Vorstufen kommen der Acetaldehyd und die aktivierte Essigsäure in Betracht.

Im höheren Organismus sind jedoch außer dem erwähnten Abbau von Äthanol und dem Abbau der Aminosäure Threonin zu Glycocoll- und Acetaldehyd durch die Threoninaldolase (74, 100) keine weiteren Wege bekannt, die zur Bildung von freiem Acetaldehyd führen. Beide Reaktionen spielen wohl im normalen Zellstoffwechsel quantitativ keine große Rolle. Der oxydative Abbau der Brenztraubensäure in höheren Organismen durch die Pyruvatoxidase führt zum Unterschied zu der oxydativen Dekarboxylierung der Brenztraubensäure in Hefezellen, wie sie von HOLZER beschrieben wurde (43), nicht zu freiem Acetaldehyd. Mit Thiaminpyrophosphat als Coenzym entsteht CO_2 und aktiver Acetaldehyd (15, 44). Daraus wird eine S-Acetyl-Verbindung der reduzierten Liponsäure gebildet, deren Acetylrest schließlich unter Bildung von aktivierter Essigsäure durch die Lipoat-Transacetylase auf Coenzym A übertragen wird (34, 35, 79, 81).

Eine größere Bedeutung als Vorstufe der Essigsäure könnte dem Acetyl-Coenzym A zukommen. Durch die Acetyl-CoA-Deacylase, einem Enzym, das in der vorliegenden Arbeit in vielen Organen der Ratte in bemerkenswerter Aktivität gefunden wurde, wird es hydrolytisch unter Verlust der energiereichen Thioesterbindung in CoA und Essigsäure gespalten (Abbildung 27).

Der hydrolytischen Spaltung entgegengesetzt verläuft die Aktivierung der Essigsäure durch die Acetat-Thiokinase. Diese Reaktion in Verbindung mit der hydrolytischen Spaltung des entstehenden Pyrophosphates durch die Pyrophosphatase (Gl. 1 u. 24) führt praktisch vollständig auf die Seite des Acetyl-CoA (66).



Das Verhältnis der Acetatbildung durch die Acetyl-CoA-Deacylase zur Acetatverwertung durch die Acetat-Thiokinase könnte unter anderem die stationäre Konzentration der Essigsäure in den Geweben bestimmen. Interessant ist in diesem Zusammenhang der Vergleich der Affinitäten beider an diesem Gleichgewicht beteiligten Enzyme zu den jeweiligen Substraten. So liegt die Michaeliskonstante der Thiokinase für Acetat aus Rattenleber bei $1,8 \times 10^{-4} \text{ M}$ (37) und die Acetatkonzentration der Rattenleber bei ca. $2,0 \times 10^{-4} \text{ M}$, die Michaeliskonstante der Deacylase für Acetyl-CoA bei $0,4 \times 10^{-4} \text{ M}$ und die Acetyl-CoA-Konzentrationen der Leber

bei $0,2 \times 10^{-4}$ M (105). Beide Enzyme sind mit ungefähr gleicher Aktivität in der Leber vorhanden (37). Die recht gute Übereinstimmung der Michaelis-Konstanten beider Enzyme mit den in der Leber gefundenen jeweiligen Substratkonzentrationen kann als eine wesentliche Voraussetzung für die Konstanz des Acetatspiegels im Blut angesehen werden. Beide Enzyme sind nur zur Hälfte mit Substrat gesättigt. Eine Steigerung des Substratangebots führt zu einer Beschleunigung des Umsatzes. Es wäre weiter zu erwarten, daß bei einer Verschiebung des Verhältnisses der Enzymaktivitäten, z. B. durch Verminderung der Thiokinaseaktivität, die hydrolytische Spaltung der aktivierten Essigsäure deren Aktivierung überwiegen müßte und somit eine ständige Acetatnettbildung zur Folge hätte. Tatsächlich konnte dies bei Tumorzellen beobachtet werden. Darauf wird später noch näher eingegangen.

Vielleicht ist auch die zunehmende Acetatfreisetzung von inkubierten Leberdünnschnitten auf eine Verschiebung dieses Aktivitätenverhältnisses zurückzuführen. Eine Aktivierung der Deacylase konnte experimentell nicht nachgewiesen werden. Geht man von der Hypothese aus, daß die Störung auf der Seite der Acetat-Aktivierung zu suchen ist, so läßt sich als Ursache der Acetatbildung bis jetzt nur vermuten: Ein direkter Aktivitätsverlust der Thiokinase im Laufe der Alterung oder ein vermindertes Angebot des die Aktivierungsenergie liefernden ATP infolge zunehmender Schädigung der energieliefernden Stoffwechsel im Laufe der Inkubation.

Über den Weg der Acetatfreisetzung in den roten Blutzellen (von Mensch, Rind und Ratte) läßt sich ebenfalls noch nichts Sicheres aussagen. Untersuchungen der Thiokinase- und Deacylaseaktivität, sowie der Konzentration des Acetyl-CoA in Erythrocyten liegen (meines Wissens) noch nicht vor. Da die Acetatbildung unter anaeroben Bedingungen ausbleibt, muß ihr eine oxydative Reaktion zu Grunde liegen.

Aus der Wirkung der Acetyl-CoA-Deacylase in Verbindung mit der Acetat-Thiokinase läßt sich auch eine brauchbare Hypothese für den Transportmechanismus des mitochondrialen Acetyl-CoA in das Cytoplasma entwickeln (111). Durch die Lokalisation der Pyruvat-Oxydase und der Enzyme der β -Oxydation in den Mitochondrien stellen diese die wichtigste Produktionsstätte für Acetyl-CoA dar. Da die Enzyme der Fettsäuresynthese extramitochondrial gelegen sind, muß das Acetyl-CoA vom mitochondrialen Raum erst dorthin gelangen. Es besteht eine Reihe von Überlegungen zu diesem Transportmechanismus (97). Vier davon sind in Abbildung 29 dargestellt:

Die erste Möglichkeit, der Übertritt des Acetyl-CoA durch die Mitochondrienmembran, setzt einen rückläufigen Transport des freien CoA voraus. Die Diffusion von CoA und seinen Derivaten durch die Mitochondrienmembran erfolgt jedoch nur langsam (56).

Ein weiterer Mechanismus des Acetyl-Gruppen-Transportes gründet sich auf die Aktivität der Carnitin-Acetyl-Transferase. Aus Carnitin und Ace-

tyl-CoA wird in den Mitochondrien Acetyl-Carnitin gebildet. Dies kann in das Cytoplasma übertreten, wo durch dasselbe Enzym wieder Acetyl-CoA entsteht (30).

Das dritte in Abbildung 28 gezeigte Beispiel beruht auf dem Zusammenwirken der Citratsynthese und des Citrat-Cleavage-Enzyms (98). Das Für und Wider dieser drei von verschiedenen Autoren vorgeschlagenen Transportmechanismen ist an anderer Stelle genauer erörtert (97). Die in Abbildung 29 an letzter Stelle gezeigte Möglichkeit des Acetyl-CoA-Übertrittes, die hydrolytische Spaltung von Acetyl-CoA zu freiem Acetat, dessen Diffusion in das Cytoplasma und folgende erneute Aktivierung durch die Acetat-Thiokinase gründet sich auf den Nachweis einer in den Mitochondrien lokalisierten Acetyl-CoA-Deacylase und auf den 10 mal höheren Gehalt der Leber an freiem Acetat ($0,20 \mu\text{Mol/g}$) im Vergleich zu Acetyl-CoA ($0,02 \mu\text{Mol/g}$) (105), Konzentrationen, die ungefähr der Halbsättigung der an diese Substraten angreifenden beteiligten Enzyme entsprechen. Gegenüber der von SRERE (98) entwickelten Vorstellung, wonach Citrat als Transportform von Acetyl-CoA angenommen wird (Beispiel 3) wäre der Essigsäure als leichter permeabler Substanz der Vorzug zu geben. Allerdings ist dieser Transportmechanismus mit dem Verlust der energiereichen Bindung des mitochondrialen Acetyl-CoA verbunden, zu dem es beim Übertritt als Acetyl-Carnitin, wie er im zweiten Beispiel dargestellt wird, nicht kommen würde. Es gibt noch keinen direkten Beweis für die Richtigkeit einer dieser Mechanismen und es könnte sein, daß alle zu einem gewissen Grad abhängig vom jeweiligen Gewebe und physiologischen Zustand des Organismus am intracellulärem Transport von Acetyl-Gruppen beteiligt sind (97).

ACETATSTOFFWECHSEL IN TUMORZELLEN

Bei den Inkubationsversuchen mit Mäuseascites-Tumoren vom Typ Ehrlich war aufgefallen, daß die Tumorzellen auffallend große Mengen Acetat produzieren. Diese Acetatbildung ist durch Zugabe von Pyruvat noch beträchtlich zu steigern, wobei etwa 30 % der zugesetzten Brenztraubensäure als Acetat freigesetzt werden und dadurch dem Stoffwechsel der Tumorzelle verloren gehen. Damit unterscheidet sich der Ascites-Tumor wesentlich vom Lebergewebe, das Acetat mit Leichtigkeit aufnimmt und unter physiologischen Bedingungen keine Acetatnettobildung über eine Konzentration von $0,10 - 0,20 \text{ mM}$ aufweist. Bei Inkubationsversuchen mit Tumorzellen stieg der Acetatspiegel im Inkubationsmedium hingegen noch bei Konzentrationen von $0,8 \text{ mM}$ Acetat linear an.

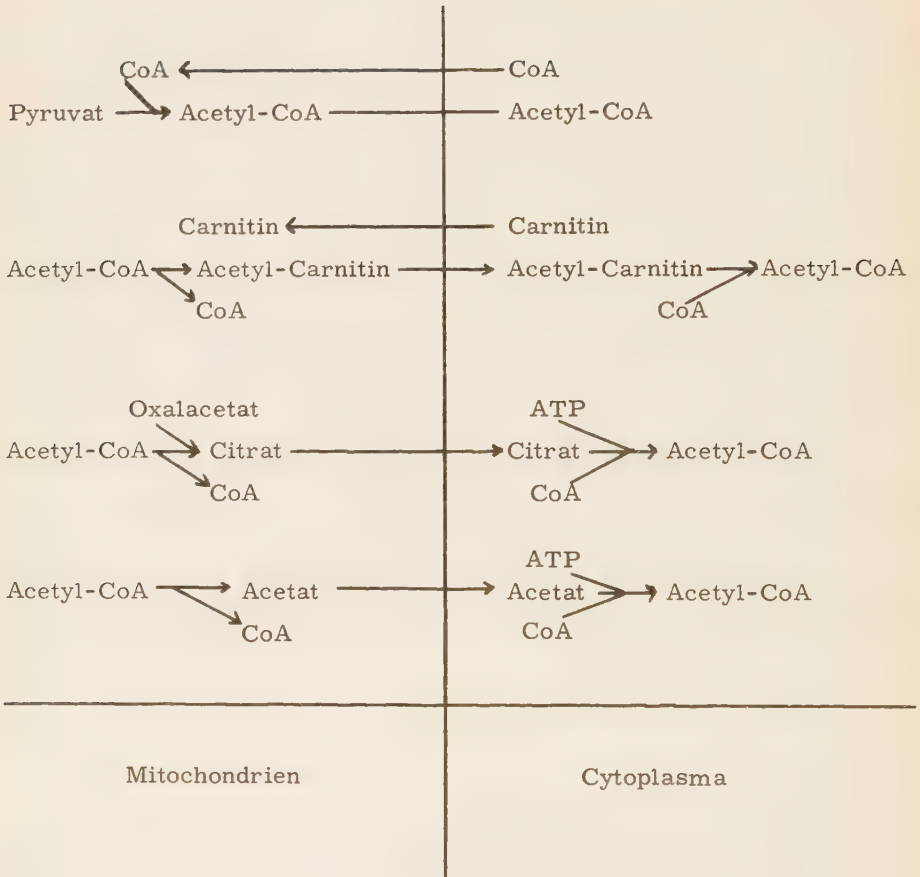


ABBILDUNG 28

Schematische Darstellung von vier Möglichkeiten des Acetyl-Gruppen-Transportes von den Mitochondrien in das Cytoplasma (nach P.A. SRERE (97)).

Schon andere Autoren hatten bei Untersuchungen des Stoffwechsels von $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Acetat in Tumorratten festgestellt, daß nach Injektion der Substanz in vivo der Großteil der Radioaktivität als Acetat in den Tumoren liegenblieb, während in anderen Geweben 70-100 % der Aktivität in der gleichen Zeit in nicht flüchtige Substanzen überging (18, 19). Außerdem wurde gefunden, daß Dünnschnitte verschiedener Tumoren auffallend wenig ^{14}C -Acetat in Lipide einzubauen vermögen (73).

Wie weitere Untersuchungen von HEPP et al. (37) erbrachten, konnte die Acetatbildung der Tumorzellen auch durch Zugabe langkettiger Fettsäuren, in Form eines Palmitat-Albuminkomplexes (28) -ähnlich wie durch Pyruvat- gesteigert werden. Die Vermutung lag deshalb nahe, daß die Vorstufe der sowohl aus Pyruvat als auch aus Fettsäuren gebildeten Essigsäure Acetyl-CoA sein müsse, das gemeinsame Endprodukt des Pyruvat- und Fettsäureabbaus, und der Weg ihrer Freisetzung die hydrolytische Spaltung von Acetyl-CoA durch die Acetyl-CoA-Deacylase. Der Grund des unterschiedlichen Acetatstoffwechsels des Ascites-Tumors und dem des Lebergewebes mußte also in einem anderen Verhältnis der Acetyl-CoA Spaltung zur Acetat-Aktivierung zu suchen sein. Diese Vorstellung ließ sich experimentell durch Aktivitätsbestimmungen der Acetat-Thiokinase und der Acetyl-CoA-Deacylase weiter unterbauen.

So fand HEPP et al. in den Tumorzellen eine auffallend geringe Aktivität der Thiokinase, die nur etwa $1/60$ des in der Leber gefundenen Wertes (37) betrug. Wie oben gezeigt wurde, liegt dagegen die Aktivität der Deacylase in beiden Geweben etwa gleich hoch. Qualitative Unterschiede beider Enzyme waren nicht festzustellen. Ihre im Leberextrakt bestimmten Michaeliskonstanten entsprachen denen im Tumorextrakt gefundenen.

Abschließend zu diesem Kapitel sei noch erwähnt, daß HEPP et al. (37) bei entsprechenden Untersuchungen anderer maligner Geschwulste (vier verschiedene Ascites-Tumoren, -davon zwei Carcinome, ein Sarkom, ein Hepatom- und ein solides Hepatom) eine ähnliche Acetatnettbildung und ein ähnliches Muster beider Enzyme, der Deacylase und der Thiokinase, finden konnte. Dies läßt vermuten, daß die Essigsäurebildung keinen Spezialfall eines bestimmten Tumors darstellt.

ACETATSTOFFWECHSEL IN DER GEFÄSSWAND BEIM DIABETES

Wie in der Einleitung ausführlicher dargestellt wurde, ist die Essigsäure der Grundbaustein für die Synthese der Lipide. Eine Reihe (10, 20, 27, 29, 82, 91) von älteren Untersuchungen liegt vor, nach denen auch die Gefäßwand von Rattenarterien zur Lipidsynthese und damit zum Einbau von Acetat in langkettigen Fettsäuren und in Cholesterin befähigt

ist. Diese gefäßwandeigene Synthese von Lipoiden wurde in der Pathogenese der Arteriosklerose als Alternative der Einlagerung vorgebildeter, komplexer Lipide in die Gefäßintima (Filtrationstheorie) vor allem durch die Arbeitsgruppe von ZILVERSMIT (84) und HOLMAN (42) gegenübergestellt. In diesem Zusammenhang verdient die im Blut gefundene Essigsäure Beachtung.

W. HOCHHEUSER et al. (39) konnte zeigen, daß die Geschwindigkeit des Acetateinbaues in die höheren Fettsäuren durch intakte Aorten normaler Ratten nicht verschieden ist von der durch partikelfreie Aortenextrakte. Diese Übereinstimmung der Syntheseraten spricht dafür, daß der Eintritt des Acetats aus dem Blut in die Gefäßwand keinen limitierenden Faktor für die Fettsäuresynthese darstellt. Weiterhin erwies es sich für die Geschwindigkeit der Fettsäuresynthese als gleichgültig, ob Acetat oder Acetyl-CoA zu dem partikelfreien Enzymsystem zugesetzt wurde. Die Acetataktivierung limitiert also ebenfalls diese Syntheseleistung der Aortenwand nicht. Für die Beurteilung, inwieweit die im Blut kreisenden Essigsäure in vivo als Substrat für die wandeigene Fettsäuresynthese der Aorta in Betracht kommt, wurde auch die Abhängigkeit des $^{14}\text{-C}$ -Acetat-Einbaus in die Aortenlipide in vitro von der Acetatkonzentration untersucht. Dabei ergab sich eine ziemlich gut dem Verlauf einer Substratsättigungskurve entsprechende Beziehung. Die Sättigungskonzentration der Essigsäure lag bei 0,50 mM, die Halbsättigung bei ungefähr 0,15 mM. Dies entspricht nun annähernd dem normalen Plasmaacetat Spiegel der Ratten von 0,19 mM. Eine Veränderung des Plasmaacetat Spiegels könnte sich folglich auf die Geschwindigkeit der Lipidsynthese der Aortenwand auswirken.

Als über längere Zeit erhöht erwies sich der Blutacetat Spiegel bei chronisch alloxandiabetischen Ratten (von 0,20 mM auf 0,30 mM). Da durch andere Autoren bei diabetischen Ratten vaskuläre Veränderungen histologisch nachgewiesen werden konnten (58), ist die Möglichkeit eines Zusammenhanges zwischen einem erhöhten Blutacetat Spiegel und dem Auftreten arteriosklerotischer Gefäßveränderungen bei der Ratte und vielleicht auch beim Menschen nicht ganz von der Hand zu weisen. Systematische Untersuchungen über das Verhalten der Essigsäure im Blut bei Sklerosepatienten und sklerosegefährdeten Personen vor allem Diabetikern, könnten dieser Hypothese in der Klinik größeres Gewicht verleihen.

E. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wird der Stoffwechsel der freien Essigsäure in höheren Organismen untersucht.

Im experimentellen Teil werden verschiedene Möglichkeiten der quantitativen Bestimmung freier Essigsäure und des an ihrer Entstehung maßgeblich beteiligten Enzyms, der Acetyl-CoA-Deacylase, beschrieben und diskutiert. Ein katalytischer Test zur Bestimmung kleinster Mengen Acetats mit Hilfe der Acetyl-Phosphat-Glucose-6-Phosphotransferase aus *Aerobacter aerogenes* wird im einzelnen beschrieben. Dieser Test wurde mit gutem Erfolg zu Untersuchungen der Acetyl-CoA-Deacylase angewandt.

Es werden weiterhin Untersuchungen des Acetatgehaltes von Blut und Geweben bei normalem und krankhaft verändertem Stoffwechsel beschrieben.

Dabei konnte die Essigsäure als regelmäßiger Bestandteil des Blutes und einiger Gewebe von Mensch und einigen Säugetieren nachgewiesen werden. Der Acetat Spiegel im Blut erwies sich als weitgehend konstant und (von Wiederkäuern abgesehen) als unabhängig von Ernährungsbedingungen. Unterschiede im Blut aus verschiedenen Abschnitten der Blutbahn waren nicht festzustellen.

Ein Anstieg des Plasmaacetat Spiegels auf ein Mehrfaches der Normalwerte war nach Genuß einer größeren Menge Alkohols zu beobachten. Einen ca. 50 % erhöhten Plasmaacetat Spiegel zeigten chronisch diabetische Ratten. Dieser Befund wurde in Hinsicht auf das bevorzugte Auftreten degenerativer Gefäßerkrankungen beim Diabetes diskutiert.

Weiter werden Untersuchungen über die Entstehung und den Verbrauch, sowie die Aufrechterhaltung des konstanten Acetat Spiegels in tierische Gewebe beschrieben.

Verantwortlich für die Aufrechterhaltung des Acetat Spiegels im Blut erscheint in erster Linie die Leber. Leberdünnschnitte und die künstlich durchströmte Leber zeigten eine beachtliche Acetataufnahme aus dem umgebenden Medium. Zu diesen Versuchen wurde der Acetat Spiegel des umgebenden Mediums innerhalb kurzer Zeit auf einen konstant bleibenden Wert, der den in vivo gemessenen Konzentrationen in Blut und Lebergewebe entspricht, gesenkt.

Eine Acetatnettbildung durch Lebergewebe war nur solange zu beobachten, bis die Acetat Konzentration im umgebenden Medium den in vivo gemessenen Wert erreicht hatte.

Eine auch bei höheren Acetat Konzentrationen im umgebenden Medium noch unverändert anhaltende Freisetzung von Acetat wurde bei roten Blutzellen sowohl in einer künstlichen Inkubationslösung wie auch in

heparinisiertem Frischblut gefunden. Eine Acetatnettoabildung weißer Blutzellen war hingegen nicht nachzuweisen.

Wesentlich vom Acetatstoffwechsel der untersuchten normalen Gewebe unterschied sich der Stoffwechsel von Ascites-Tumor-Zellen. Bei inkubiertem Mäuseascites-Tumor, Typ Ehrlich, war eine Acetatfreisetzung zu beobachten, die mit ca. $0,3 \mu\text{Mol/Stunde} \times \text{ml Ascites-Tumor}$ die Acetatfreisetzung von Blut um das Sechsfache übersteigt. Diese Acetatbildung durch Tumorzellen war durch Zusatz von Pyruvat noch um ein Vielfaches zu steigern. Ungefähr ein Drittel des den Zellen angebotenen Pyruvats erschien als Acetat in der Inkubationslösung. Diese Stimulierung der Acetatbildung durch Pyruvat war durch anaerobe Versuchsbedingungen zu unterdrücken. Alles Pyruvat wurde dabei zu Laktat umgesetzt.

Schließlich werden Ergebnisse beschrieben über Vorkommen, Aktivität und Substrataffinität der Acetyl-CoA-Deacylase. Diese lassen vermuten, daß die enzymatisch-hydrolytische Spaltung des Acetyl-CoA maßgeblich an der Entstehung freier Essigsäure im höheren Organismus beteiligt sein dürfte. Die Deacylase kommt in allen Geweben in beträchtlicher Aktivität vor. Ihre Michaelis-Konstante liegt im Bereich der in tierischen Geweben gemessenen Konzentrationen an Acetyl-CoA.

Die Ergebnisse über die Acetyl-CoA Deacylase in Verbindung mit entsprechenden Ergebnissen anderer Autoren über die Acetat-Thiokinase werden eingehender diskutiert. Das Gegenspiel der durch diese beiden Enzyme katalysierten Reaktionen, der Acetataktivierung und der hydrolytischen Spaltung von Acetyl-CoA, erscheint von Bedeutung für die stationäre Konzentration an Acetat in den Geweben, sowie für die Acetatfreisetzung durch Tumorzellen. Weiterhin bildet der vorgeschlagene "Kreislauf des Acetates" die Grundlage einer Hypothese für den Transportmechanismus des Acetyl-CoA durch Zellmembranen.

F. L I T E R A T U R A N G A B E

- (1) AISENBERG, A. C. : The Glycolysis and Respiration of Tumors,
Academ. Press, New York and London
(1961)
- (2) AWISON, A. W. D. : J. Chem. Soc. 1955, 732. Siehe auch:
Methods of Enzymology by Colowick and
Kaplan
Vol. 3, p 228-31
- (3) BARTLEY, W. : Biochem. J., 53, 305 (1953)
- (4) BEILSTEINS Handbuch der org. Chemie,
Bd. 2, 97 (1920)
- (5) BEISENHERZ, G., H. J. BOLZE, Th. BÜCHER, R. CSOK,
K. H. GARBAD, E. MEYER-ARENDT und G. PFLEIDERER:
Zeitschr. Naturforsch., 86, 555 (1953)
- (6) BERGMAYER, H. : Methoden der Enzym. Analyse (1962)
- (7) BERGMAYER, H. : Persönl. Mitteilung
- (7a) BERGMAYER, H. und H. MÖLLERING:
Biochem. Zeitschr. 343, 97-102 (1965)
- (8) BLOCH, K., C. CLARK und J. HARARY:
J. B. C., 211, 687 (1954)
- (9) Fa. BOEHRINGER: Biochemica Informationen, Mannheim
- (10) BOLKER, H. J. : J. Exp. Med. 103, 199 (1956)
- (11) BRADY, R. O. : Proc. nat. acad. Sci. (Wash.), 44, 993 (1958)
- (12) BRATTON, A. C. und E. K. MARSHALL:
J. B. C., 128, 537 (1939)
- (13) BRAUER, C., A. PESOTTI und PIZZOLATO:
Proc. Soc. exp. Biol., 78, 174 (1951)
- (14) BRAY, G. A. : Analyt. Biochem., 1, 279 (1960)
- (15) BRESLOW, R. : J. Am. Chem. Soc., 80, 3719 (1958)
- (16) BUCHER, E. und J. MASCHHEIMER:
Ber. 38, 620 (1965)
- (17) BÜTTNER, H. : Gemeinsame Tag. d. deutsch., schweiz.
und franz. Biochem. Strasbourg,
Sept. 1963
- (18) BUSCH, H. : Canc. Res., 13, 789 (1953)

- (19) BUSCH, H. und H. A. BALTRUSCH:
Canc. Res., 14, 448 (1954)
- (20) CHERNICK, S., P. A. SRERE und J. L. CHAIKOFF:
J. B. C., 179, 113 (1949)
- (21) CONWAY, E. J.: Mikrodifffusion Analysis, 4th ed. London,
Crosby, Lochwood and Son Ltd.
- (22) DECKER, K.: Die aktivierte Essigsäure,
Ferdinand Enke Verlag, Stgt. (1956)
- (23) DEUTIKE, U.: Persönliche Mitteilung
- (24) DE DUVES, Ch.: In: Subcellular Particles (T. Hayashi, ed.),
p. 128, New York, Ronald Press (1959)
- (25) DE DUVES, Ch.: In: Lysosomes, Ciba Foundation Symposium,
(Dereuck, A. V. S., and M. P. Camerson, eds.)
P. 1. London. Id. A. Churchill, Ltd., (1963)
- (26) EHRHARDT, H. und E. DÖRFLER:
Blut, 10, 231-35 (1964)
- (27) EISLEY, N. F. und G. H. PRITHAM:
Science, 122, 121 (1955)
- (28) FILLERUNP, D. L., I. C. MIGLIORE, J. F. MEAD:
J. B. C., 233, 98 (1958)
- (29) FORSTER, D. W. und M. D. SIPERSTEIN:
Amer. J. Physiol., 198, 25 (1960)
- (30) FRITZ, J. B., S. SCHULTZ, P. A. SRERE:
J. B. C., 238, 2509 (1965)
- (31) GEIGY, Wiss. Tab., 6. Aufl., S. 533 (1960)
- (32) GERGELY, J., P. HELE und C. V. RAMAKRISCHNAN:
J. B. C., 198, 323 (1952)
- (33) GRASSMANN, W. und K. HANNIG:
Zeitschr. physiol. Chem., 290, 1, (1952)
- (34) GUNSALUS und Mitarb.:
J. Am. Chem. Soc., 78, 1763 (1956)
- (35) GUNSALUS: Fed. Proc., 13, 215 (1954)
- (36) HEPP, D.: Persönl. Mitteilung
- (37) HEPP, D., E. PRÜSSE, H. WEISS und O. WIELAND:
Biochem. Z., 344, 87-102 (1966)
- (38) HEPP, D., E. PRÜSSE, H. WEISS und O. WIELAND:
Adv. Enz. Reg., Vol. 4, 90-105 (1966)

- (39) HOCHHEUSER, W., H. WEISS und O. WIELAND:
Zeitschr. für klin. Chemie, 6, 175 (1964)
- (40) HOGEBOOM, C. H.: Methods of Enzymology by Colowick a. Kaplan, vol. 1, 16 (1955)
- (41) HOHORST, H. J., F. H. KREUTZ und Th. BÜCHER:
Biochem. Z. 332, 18 (1959)
- (42) HOLMAN, R. L., H. C. Mc GILL jr. et al:
Hormones and Arteriosclerosis, Hrsg. G. Pincus, S. 123, Academ. Press, New York (1959)
- (43) HOLZER, H. und H. W. BOEDDE:
Biochem. Z., 329, 175 (1957)
- (44) HOLZER, H. und H. W. GOEDDE, K. H. GOGGEL und B. ULRICH:
Biochem. Biophys. Res. Commun. 3, 599 (1960)
- (45) KAPLAN, N. O. und LIPMAN, F.:
In Methods of Enzymology by Colowick a. Kaplan, vol. I, p. 101
- (46) KAMEL, M. Y. und R. L. ANDERSON:
J. B. C., 239, 10 (1964)
- (47) KNOOP, F.:
Oxydation im Tierkörper, Ferdinand Enke Verlag, Stgt. (1931)
- (48) KORFF, R. W. von: J. B. C., 210, 539 (1954)
- (49) KRAMPITZ, L. O., G. GREULL, C. S. MILLER, J. B. BICKING, H. R. SKEGGS und J. M. SPRAGUE:
J. Am. Chem. Soc., 80, 5893 (1958)
- (50) KREBS, H. A. und K. HENSELEIT:
Hoppe Seyler, 210, 33 (1932)
- (51) KREBS, H. A. und W. A. JOHNSON:
Enzymologia, 4, 148 (1937)
- (52) KREBS, H. A. und W. A. JOHNSON:
Biochem. J., 31, 645 (1937)
- (53) LIPMAN, F.: J. B. C., 134, 463 (1940)
Enzymologia, 4, 65 (1934)
- (54) LIPMAN, F.: J. B. C., 160, 173 (1945)
- (55) LIPMAN, F.: Harvey Lect., 44, 99 (1948)

- (56) LOEWENSTEIN, J. M.:
The Control of Lipid Metabolism, 57, Aca-
dem. Press, New York (1963)
- (57) LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR and R. J. RANDAL:
J. B. C. 193, 265 (1951)
- (58) LUNDBACK, K., K. NIELSON, T. STEEN OLSEN, O. J. RAIÆESEN
und H. OKSKOV:
Fifth Congress of International Diabetes
Federation, Toronto, 20-24 July (1964),
Abstracts of Papers, Nr. 54, S. 31
- (59) LUNDQUIST, F.:
Acta physiol. scand., 50 suppl., 175, 97
(1960)
- (60) LUNDQUIST, F., U. FUGMANN und H. RASMUSSEN:
Biochem. J., 80, 393 (1961)
- (61) LUNDQUIST, F.:
Nature, London, 193, 589 (1962)
- (62) LUNDQUIST, F.:
J. clin. invest. 41, 955 (1962)
- (63) LYNEN, F.:
Liebigs Ann., 552, 370 (1942)
- (64) LYNEN, F.:
Liebigs Ann., 574, 33 (1951)
- (65) LYNEN, F., E. REICHERT und L. RUEFF:
Liebigs Ann., 578, 1 (1951)
- (66) LYNEN, F. und K. DECKER:
Ergebn. Physiol. biol. Chem. exp. Pharma-
kol., 49, 327 (1957)
- (67) LYNEN, F., U. HENNING, C. BUBLITZ, B. SÖRBO und
KROEPLIN-RUEFF, L.:
Biochem. Zeitschrift, 330, 269 (1958)
- (68) LYNEN, F.:
J. cell. comp. Physiol., 54, Suppl. 1, 33
(1959)
- (69) LYNEN, F., P. A. SRERE and W. SEUBERT:
Biochim. biophys. Acta (Anat.), 33, 313
(1959)
- (70) LYNEN, F., L. WESSELY, O. WIELAND und L. RUEFF:
Angew. Chemie, 64, 687 (1962)
- (71) MARTIUS, C. und F. KNOOP:
Zeitschrift phys. Chem. I, 246 (1937)
- (72) MATSCHINSKY, F., U. MEYER und O. WIELAND:
Biochem. Zeitschr., 333, 33 (1960)
- (73) MEDE, G. A., J. THOMAS und S. WEINHOUSE:
Canc. Res., 13, 27 (1953)

- (74) MELTZER und SPRINSON:
J. B. C., 197, 461 (1952)
- (75) MILLER, L., C. G. BILY, U. WATSON, W. F. BALE:
J. exp. Med., 94, 431 (1951)
- (76) NACHMANSOHN, D. und M. J. BERGMAN:
J. B. C., 165, 551 (1946)
- (77) NECUILLA, N.: Diss. München (1941)
- (78) NOVELLI, G. D. und F. LIPMAN:
J. B. C., 182, 213 (1950)
- (78a) NUMA, S., M. MATSUHASHI und F. LYNEN:
Biochem. Zeitschrift, 334, 203-217 (1961)
- (79) OCHOA; S.: Adv. Enzymol., 15, 183,
(1954)
- (80) ROSE, I. A.: Methods of Enzymology, vol. I., p. 591,
Ed. by Colowick, S. P. and Kaplan. N. C.
- (81) SANADI und SEARLS: Biochem. Biophys. Acta., 24, 220 (1957)
- (82) SCHWENK, E. und N. T. WERTHESSEN:
Arch. Biochem. Biophys. 40, 334 (1952)
- (83) SEUBERT, W., G. GREULL und F. LYNEN:
Angew. Chemie, 69, 359 (1957)
- (84) SHORE, M. L., D. B. SILVERSMITH und R. F. ACKERMANN:
Amer. J. Physiol., 181, 527 (1955)
- (85) SIMON, E. J. und D. SHEMIN:
J. Amer. Chem. Soc., 75, 2520 (1963)
- (86) SIPERSTEIN, M. D., J. L. CHAIKOFF und S. CHERNICK:
Science, 113, 747 (1951)
- (87) SOODAK, M. und F. LIPMAN:
J. B. C., 175, 999 (1948)
- (88) SOODAK, M. und F. LIPMAN:
Fed., Proc., 7, 190 (1948)
- (89) SOODAK, M.: In Methods of Enzymology, vol. 3, p. 266,
Ed. by Colowick, S. P. and Kaplan, N. O.
- (90) SPITZY, H., M. REESE und Ch. SKRUBE:
Mikrochem. Acta, 4, 502 (1958)
- (91) STADTMAN, E. R., M. DOUDOROFF und F. LIPMAN:
J. B. C., 191, 377 (1951)

- (92) STERN, J. und OCHOA, S.:
J. B. C., 179, 491 (1949)
- (93) STERN, J. R., B. SHAPIRO, E. R. STADTMAN und S. OCHOA:
J. B. C., 193, 703 (1951)
- (94) STERN, J. R., S. OCHOA und F. LYNNEN:
J. B. C., 198, 313 (1952)
- (95) STERN, J. R., S. OCHOA und F. LYNNEN:
J. B. C., 198, 313 (1952)
- (96) STERN, J. R., S. OCHOA und F. LYNNEN:
J. B. C., 198, 313 (1952)
- (97) SRERE, P. A.: Nature, 205, 766 (Febr. 1965)
- (98) SRERE, P. A. und A. BADHURI:
Biochem. Biophys. Acta., 59, 487 (1962)
- (99) TABOR, H., H. A. MEHLER und E. R. STADTMAN:
J. B. C., 204, 127 (1953)
- (100) VILENKINA: Doklady Akad. Nauk. S. S. S. R., 69, 385
(1954)
- (101) WAKIL, S. J.: J. Amer. chem. Soc., 80, 6465 (1958)
- (102) WAKIL, S. J., E. B. TITCHENER und D. M. GIBSON:
Biochem. Biophys. Acta, 29, 225 (1958)
- (103) WALKER, P. G.: Biochem. J., 58, 699 (1954)
- (104) WEINHOUSE, S., G. MEDES, N. F. FLOYD und N. NODOA:
J. B. C., 161, 745 (1945)
- (105) WEISS, L.: Diss. München (1963)
- (106) WIELAND, H.: Erg. der Phys. XX, 477 (1922)
- (107) WIELAND, H. und R. SONDERHOFF:
Liebigs Ann., 499, 213 (1932)
- (108) WIELAND, O.: Biochem. Z., 329, 313 (1957)
- (109) WIELAND, O. und I. EGER-NEUFELDT:
Hoppe Seylers Z. physiolog. Chem., 324,
101 (1961)
- (110) WIELAND, O. und L. WEISS:
Biochem. Biophys. Res. Comm., 10,
333 (1963)

- (111) WIELAND, O. und H. WEISS:
Gemeinsame Tagung der Deutschen, Schweizer und Französischen Biochemikern,
Straßburg, Sept. 1963
- (112) WIELAND, O., L. WEISS und L. EGER-NEUFELDT:
Biochem. Z., 339, 501 (1964)
- (113) WIELAND, O., H. WEISS und W. HOCHHEUSER:
In Pathophys. u. klin. Aspekte d. Fettstoffwechsels (Eds.: G. Schettler u. R. Sanwald)
Georg Thieme Verl. Stuttgart, 1966
- (114) WIELAND, O.:
Münchner Med. Wochenschrift, 108,
1653-61 (1966)

An dieser Stelle möchte ich meinem sehr verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. Otto WIELAND, für die Überlassung des Themas und für seine unermüdliche Unterstützung dieser Arbeit ergebenst danken.

LEBENS LAUF

Am 26. April 1940 wurde ich, Hanns Weiß, als Sohn des prakt. Arztes Dr. med. Hanns Weiß und seiner Frau Emmy in Bad Mergentheim geboren. Dort besuchte ich die Volksschule und das Deutschorden-Gymnasium, wo ich am 11. März 1959 die Reifeprüfung ablegte.

Im Sommersemester 1959 begann ich an der Universität Freiburg i. Br. mein Medizinstudium. Nach der ärztlichen Vorprüfung am 24. Oktober 1961 wechselte ich zur Universität München, wo ich mein Medizinstudium mit dem Staatsexamen am 22. Dezember 1964 beendete.

Seit dem Sommersemester 1965 studierte ich an der Universität München als Zweitstudium Chemie. Am 21. Oktober 1966 legte ich die Diplom-Vorprüfung ab, am 30. Mai 1968 die Diplom-Prüfung.

Während meiner Semesterferien arbeitete ich als Medizinalassistent am Chirur. Kreiskrankenhaus, auf der Inneren Abt. des Caritas-Krankenhauses, beide in Bad Mergentheim, und in der Universitäts-Frauenklinik in Würzburg.

